

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FERNANDA DAL'MASO CAMERA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO DE PALHA, DANO TECIDUAL E EFEITO
NUTRACÊUTICO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) NO PULMÃO DE
CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO CIGARRO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Professor Orientador: Dr. Ricardo Aurino de Pinho

**CRICIÚMA (SC)
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C182c Camera, Fernanda Dal'maso.

Caracterização química do cigarro de palha, dano tecidual e efeito nutracêutico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) / Fernanda Dal'maso Camera ; orientador: Ricardo Aurino de Pinho, – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.
84 p: il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2016.

1. Cigarro de palha – Efeito fisiopatológico. 2. Cigarro de palha – Caracterização química. 3. Fumo – Efeito fisiopatológico. 4. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) – Efeito nutracêutico. I. Título.

CDD. 22ª ed. 613.85



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DA 61ª DEFESA DE TESE

Ata da Defesa Pública de Tese de Doutorado de **Fernanda Dal' Maso Camera**. Aos trinta e um dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezesseis às 16h00, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta pelos senhores professores: **Dr. Paulo César Lock Silveira** (Membro Relator - UNESC), **Dr. Felipe Dal Pizzol** (Membro Interno - UNESC), **Dra. Patrícia de Aguiar Amaral** (Membro Externo - UNESC) e **Dr. Samuel dos Santos Valença** (Membro Externo – UFRJ), e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüírem a tese de Doutorado de **Fernanda Dal' Maso Camera**, subordinada ao título: “**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO DE PALHA DANO TECIDUAL E EFEITO NUTRACÊUTICO DA ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS ST. HIL.) NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO CIGARRO**”. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube a candidata, de forma regimental, expor o tema de sua tese, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionada pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final da candidata. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Tese, declarou **Fernanda Dal' Maso Camera** aprovada.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador PPGCS

Prof. Dr. **CLAUDIO TEODORO DE SOUZA** (Presidente do Colegiado de Coordenação)

Prof. Dr. **RICARDO AURINO DE PINHO** (Orientador)

BANCA EXAMINADORA:

Paulo Cesar Lock Silveira
Prof. Dr. **PAULO CÉSAR LOCK SILVEIRA** (Membro Relator - UNESC)

Felipe Dal Pizzol
Prof. Dr. **FELIPE DAL PIZZOL** (Membro Interno - UNESC)

Dra. Patricia de Aguiar Amaral
Prof.ª **Dra. PATRÍCIA DE AGUIAR AMARAL** (Membro Externo - UNESC)

Samuel dos Santos Valença
Prof. Dr. **SAMUEL DOS SANTOS VALENÇA** (Membro Externo – UFRJ)

Fernanda Dal' Maso Camera
CANDIDATA: **FERNANDA DAL'MASO CAMERA**

Criciúma, SC, 31 de agosto de 2016.

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.
Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense –
UNESC.

AGRADECIMENTOS

É com muito amor e gratidão que dedico esta tese à minha querida e amada Dinda, Talita Carles (in memorian), que acompanhou grande parte deste sonho. Infelizmente, hoje não está mais conosco, mas tenho a certeza que do Céu, como uma linda estrela, olha por nós e está vibrando com mais esta minha conquista.

Aos meus pais, Daniel e Maria Ivone Dal'Maso, serei eternamente grata por todos os ensinamentos recebidos durante a vida. Muitos anos se passaram, mas a base do que sou hoje está na minha família. Por isso, só tenho a agradecer pelo cuidado, pelo amor e pelo incentivo, de sempre me orientarem a não desistir dos meus sonhos.

Não posso também deixar de agradecer todo o auxílio do vovô Daniel e da vovó Ivone, às inúmeras vezes que ajudaram nos cuidados com as crianças durante o período em que estive fora para estudar. Muitos desenhos, pinturas, brincadeiras de Cinco Marias, enfim, tudo isso ficará de lembrança... Obrigada por tudo de coração!!

Aos meus amados e queridos filhos, Bruno e Gustavo. Quando a mamãe iniciou o doutorado, vocês eram bebês e pouco entendiam porque a mamãe viajava e precisava estudar nos finais de semana... Hoje, já maiores, entendem e compreendem bem todo o processo. O Bruno até pergunta se pode ser pesquisador quando crescer... amado!! De coração, a mamãe só tem a agradecer por todas as vezes que vocês, mesmo pequenos, entenderam que eu precisava me ausentar para concretizar este sonho. Confesso que muitas vezes viajei de coração apertado em deixá-los, mesmo sabendo que ficariam bem e seriam bem cuidados pelo papai, pelos avós, pela tata... Mas tinha a certeza de que esta jornada exaustiva um dia terminaria e meu sonho seria concretizado. A vocês, amores da minha vida, muito obrigada!! A mamãe agora terminou o trabalho.

Ao meu esposo, Rafael Camera, grande amor da minha vida. Você e as crianças, sem dúvida, fizeram parte desta linda história. Só tenho a agradecer pelo apoio recebido durante todo este tempo, pois em muitos momentos me ausentei e tu, com muito amor e carinho, cuidou dos nossos filhos, sempre de forma exemplar. Tu foste, além de esposo, um companheiro fiel e um pai responsável e dedicado. Obrigada por proporcionar a realização deste estudo. Tu sabes o quanto eu queria e o quanto me sinto feliz em poder concluí-lo. Sem o teu apoio, jamais eu teria conseguido. Muito obrigada, meu amor, por tudo!!!

À minha Família: minhas irmãs, Leanete, Daniela e Gabriela; meus sobrinhos, Guilherme, Augusto, Caroline, Bruna e Estevão. Obrigada pelo apoio e força, pois muitas vezes deixei de estar com vocês para buscar este sonho. Vocês são muito especiais e moram no meu coração.

*Ao meu sogro, Nerci, minha sogra, Ivone, e minha cunhada, Larissa, que muitas vezes se deslocaram de suas residências para auxiliar nos cuidados com as crianças, fazendo companhia, brincando de bola, fazendo um churrasquinho, um bolo, uma pipoca. Só tenho a agradecer!!!
Belas recordações ficarão guardadas no coração deles.
Vocês também foram fundamentais. Muito Obrigada!*

Às tatas, Jaqueline, Andreia e Deisi. A vocês meu eterno agradecimento por terem cuidado dos meus filhos com tanto amor e carinho na minha ausência. Jamais esquecerei!!!

*Aos amigos próximos ou distantes, agradeço pelo carinho e pela paciência. Sei que muitas vezes não foi possível o encontro, mas saibam que todos são especiais e moram no meu coração.
Em breve iremos nos encontrar e cultivar essa amizade.*

*Ao Professor e orientador Ricardo, muito obrigada de coração!!!
Serei eternamente grata por todos os ensinamentos adquiridos durante estes quatro anos.
És um excelente profissional, uma pessoa maravilhosa, um orientador exemplar e um pesquisador de extrema excelência, o qual tive o privilégio de ser orientanda.
Obrigada por tudo!*

Ao Professor Paulo, obrigada de coração pelas orientações e encaminhamentos durante o período em que o Professor Ricardo esteve fora do Brasil.

*Aos Professores e colegas da URI Rogério, Alice e Silvane e Professor Tiago da UNESC, agradeço imensamente por todo apoio, parceria e colaboração para realização deste trabalho.
Vocês foram fundamentais!!!
Parabéns pelo excelente exemplo de pesquisadores e pela dedicação a pesquisa.
Com certeza levarei comigo muitas lembranças.*

*Ao grupo de colegas do Lafibe, Priscila, Talita, Pauline, Giulia, todos os alunos de iniciação científica, e em especial a Renata, que me ajudou muito nessa fase final da tese, meu sincero agradecimento por sempre me receberem felizes, auxiliarem no que foi preciso, por todas as trocas de experiências que foram realizadas. Serei sempre grata por todo o trabalho de vocês, que contribuiu muito no meu estudo.
Muito obrigada!!!*

*Ao grupo de colegas de doutorado da URI Erechim, só tenho a agradecer por toda a parceria, coleguismo e amizade, pois foram muitos quilômetros rodados, nem sei dizer quantos... Só sei que ir e vir com vocês tornavam as viagens mais alegres e descontraídas. Quanta risada... Quantas conversas... Quantos lanches, cuias de chimarrão... Quantos desabafos...
Crescemos de todas as formas juntos!!!*

*Estes momentos com certeza ficarão guardados em meu coração.
Sentirei saudades...*

*Mari Lucia Sbardelotto
Ana Lúcia Bernardo de Carvalho Morsch
Miriam Wisniewski
Márcia Bairos de Castro
Janesca Mansur Guedes
Elvis Wisniewski
Wolnei Luiz Amado Centenaro
Irany Achilles Denti*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS,
Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.
Muito obrigada!!! Foi muito bom estar na UNESC!!!*

*Ao colegiado do PPGCS,
À Coordenação: Dr. Cláudio Teodoro de Souza e
Dra. Vanessa Moraes de Andrade
À Secretária Diana Ghisi Daniel, por toda a orientação e ajuda.*

*À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim,
Elisabete Maria Zanin, Paulo Roberto Giollo e Paulo José Sponchiado,
pelo apoio financeiro e acadêmico.*

*Aos meus queridos alunos da Graduação.
Obrigada pelo carinho!*

*E, finalmente, a Deus, por proporcionar a concretização
deste grande sonho e por estar comigo e com a minha
família em todos os momentos das nossas vidas!!*

*“Ninguém é digno do pódio se não usar suas derrotas para alcançá-lo.
Ninguém é digno da sabedoria se não usar suas lágrimas para cultivá-la.
Ninguém terá prazer no estrelato se desprezar a beleza das coisas simples no anonimato. Pois
nelas se escondem os segredos da felicidade.”*

Augusto Cury

RESUMO

O tabagismo é considerado um grave problema de saúde pública, com alta prevalência de morbimortalidade de seus usuários. Os efeitos anátomo-fisiológicos, bioquímicos e moleculares da fumaça do cigarro industrial estão bem investigados, porém são inexistentes essas observações a partir do cigarro de palha. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. HIL.) contém elevado teor de metilxantinas e compostos fenólicos, é considerada um antioxidante natural com potencial efeito nutracêutico, sendo necessários estudos que avaliem estes efeitos na fumaça do cigarro de palha. O objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente o cigarro de palha e verificar as alterações histopatológicas, bioquímicas e moleculares no pulmão de camundongos Swiss expostos cronicamente à sua fumaça e tratados com 1% de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Materiais e Métodos:** A metodologia foi dividida em dois estudos. O primeiro estudo (estudo 1) caracterizou quimicamente o cigarro de palha e verificou os possíveis danos provocados no pulmão, traqueia e fígado a partir de um modelo experimental de inalação à sua fumaça. O segundo estudo (estudo 2) avaliou os efeitos do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) sobre as alterações histopatológicas e bioquímicas no pulmão. O estudo 1 contou com 18 camundongos Swiss divididos em três grupos: controle (C), cigarro de palha (CP) e cigarro industrial (CI); e o estudo 2 com 48 camundongos Swiss divididos em seis grupos: controle (C), erva-mate 1% (EM), cigarro de palha (CP), cigarro de palha + erva-mate 1% (CP+EM), cigarro industrial (CI) e cigarro industrial + erva-mate 1% (CI+EM). Os animais foram expostos a 12 cigarros/dia em câmaras individuais para roedores, 3x/dia, durante 30 e 60 dias (1º e 2º estudo), sendo após todos eutanasiados. **Resultados:** O CP e CI apresentaram composição metálica semelhante, com teores maiores que 60 µg/g para o Fe e Mn. O CP apresentou maior teor de CO em relação ao CI. Não houve diferenças entre os cigarros nos HPAs. Após 60 dias de exposição à fumaça o pulmão dos animais expostos ao CP apresentou áreas fibróticas, alargamento alveolar e hemorragia. O grupo exposto ao CI apresentou alargamento e espessamento de septo alveolar. Os animais suplementados com EM apresentaram septos alveolares íntegros. Os grupos (CP, CI + EM) apresentaram área alveolar íntegra e diminuição da área fibrótica. O grupo (EM+CP) demonstrou diminuição significativa da área alveolar. A produção de DCF foi maior nos grupos CP e CI, com uma redução significativa no grupo que suplementou EM. O nitrito não apresentou alteração nos grupos CP e CI. As carbonilas aumentaram nos grupos CP, CI e (CI+EM), enquanto no (CP + EM) os níveis reduziram. Os níveis de tióis não apresentaram diferenças em ambos os cigarros. A nitrotirosina, reduziu quando suplementados com EM. A MMP-3, aumentou significativamente nos grupos CI e CP. Os níveis de VEGF foram maiores no grupo CP. **Conclusão:** O CP apesar de ser artesanal é um tipo de tabaco tóxico e maléfico à saúde, pois causa danos no sistema pulmonar. A EM 1% mostrou-se um produto antioxidante com alta capacidade antioxidante e nutracêutica em pulmão de animais expostos à fumaça crônica.

Palavras-chave: cigarro de palha, cigarro industrial, íons metálicos, pulmão, erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil), antioxidante, nutracêutico.

ABSTRACT

Smoking is considered a serious public health problem with a high prevalence of morbidity and mortality of its users. Although the anatomical, physiological, biochemical and molecular effects of smoke from the manufactured cigarette are well investigated, there are no studies about the cornhusk cigarette. Since the yerba mate (*Ilex Paraguariensis* ST. HIL) contains high content of methylxanthines and phenolic compounds, and is considered a natural antioxidant with potential nutraceutical effect and more studies are needed to assess these effects in the cornhusk cigarette smoke. The objective of this study was to characterize the chemical constituents of cornhusk cigarette and identify the effect of cornhusk in histopathological, biochemical and molecular changes in the lung of Swiss mice chronically exposed to cornhusk cigarette and treated with 1% of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Materials and Methods:** The methodology was divided into two studies. The first one was (study 1) characterized the chemical constituents of cornhusk cigarette and investigated the possible damage in the lung, trachea and liver from an experimental model of inhalation of cigarette smoke. The second one was (study 2) assessed the effects of yerba mate extract (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.) on histopathological and biochemical changes in the lung. Study 1 included 18 Swiss mice, which were divided into three groups: control (C), cornhusk cigarette (CC) and manufactured cigarette (MC). Study 2 consisted of 48 Swiss mice divided into six groups: control (C), 1% of yerba mate (YM), cornhusk cigarettes (CC), cornhusk cigarette + 1% of yerba mate (CC + YM), manufactured cigarette (MC) and manufactured cigarette + 1% of yerba mate (MC + YM). The animals were exposed to 12 cigarettes a day (three times a day) in individual chambers for rodents for 30 and 60 days (study 1 and 2, respectively). After that, all the animals were euthanized. **Results:** CC and MC showed the similar metal composition with higher levels than 60 mg / g for Fe and Mn. CC had higher content of CO than MC. There was no difference between the cigarettes in PAHs. After 60 days of exposure to smoke, the lungs of animals exposed to CC had fibrotic areas, alveolar enlargement and bleeding. The group exposed to MC had enlargement and alveolar septal thickening. The animals supplemented with YM showed intact alveolar septa. CC and MC + YM groups had intact alveolar area, as well as a decrease in the fibrotic area. YM + CC group showed a significant decrease in the alveolar area. DCF production was higher in CC and MC groups with a significant reduction in the group supplemented with YM. There was no change in nitrite in CC and MC groups. Levels of carbonyls increased in CC, MC and MC + YM groups, and reduced in CC + YM. Levels of thiols had no differences in both cigarettes. Nitrotyrosine was reduced when supplemented with YM A MMP-3, and significantly increased in MC and CC groups. VEGF levels were higher in CC group. **Conclusion:** Despite being handmade, CC is a type of toxic and harmful tobacco to people's health, which causes damage to the pulmonary system. 1% of yerba mate extract was revealed to be an anti-free radical with high antioxidant and nutraceutical capacity in the lung of animals exposed to the chronic smoke.

Keywords: hand-rolled cornhusk cigarette, manufactured cigarette, metal ions, lung, yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil), antioxidant, nutraceutical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécies reativas de oxigênio na mitocôndria	33
Figura 2. Efeitos do estresse oxidativo nas doenças pulmonares crônicas	33
Figura 3. Efeitos biológicos da erva-mate	35
Figura 4. Propriedades térmicas do fumo de corda (em pedaço), do tabaco macerado/descascado e da palha do milho	49
Figura 5. Fotomicrografia do tecido pulmonar	50
Figura 6. Fotomicrografia da traqueia	51
Figura 7. Fotomicrografia do tecido hepático	52
Figura 8. Imagens de cortes longitudinais do tecido pulmonar corados com coloração de H&E e quantificação do diâmetro alveolar médio de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro industrial e de palha e tratados com erva-mate	57
Figura 9. Efeito da erva-mate sobre a produção de DCF nitrito e GSH no pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro industrial e de palha	58
Figura 10. Efeito da erva-mate sobre os níveis de proteínas carboniladas, tióis totais e nitrotirosina no pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro industrial e de palha	59
Figura 11. Efeito da erva-mate sobre os níveis de MMP-3 e VEGF no pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro industrial e de palha	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise dos metais identificados no fumo em corda (cigarro de palha), fumo industrial (cigarro industrializado) e palha de milho	47
Tabela 2. Resultados referentes aos teores de Material Particulado (MP) e monóxido de carbono	48
Tabela 3. Análise dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	49

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

As – Arsênio
CAT – Catalase
CO – Monóxido de carbono
CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
Cd – Cádmio
Co – Cobalto
Cr – Cromo
Cu – Cobre
DCNT – Doença crônica não transmissível
DCV – Doença cardiovascular
DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DCF – 2,7-Dichlorodihydrofluorescein
ERN – Espécie reativa de nitrogênio
ERO – Espécie reativa de oxigênio
Fe – Ferro
GOLD – Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, do inglês *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*
GPx – Glutathione peroxidase
GSH – Glutathione reduzida
GSSG – Glutathione oxidada
H&E – Hematoxilina e Eosina
H₂N₂ – Peróxido de hidrogênio
HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA – Instituto Nacional de Câncer
MP – Material particulado
MMP-3 – Matrix metalloproteinase 3
Mn – Manganês
Ni – Níquel
OMS – Organização Mundial da Saúde
ON – Óxido nítrico
PFA – Paraformaldeído
PETAb – Pesquisa nacional por amostra de domicílio/Tabagismo
Pb – Chumbo
Se – Selênio
Sn – Estanho
SBPT – Sociedade Brasileira de Pneumologia
SOD – Superóxido dismutase
TGA – Análise termogravimétrica
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	27
1.1 ORGANIZAÇÃO DA TESE	29
1.2 JUSTIFICATIVA	29
1.3 REFERENCIAL TEÓRICO	30
1.3.1 O tabaco e suas principais formas de consumo e efeitos sobre a saúde	30
1.3.2 Alterações histopatológicas induzidas pelo tabaco	31
1.3.3 Estresse oxidativo e tabaco	32
1.3.4 Erva-mate	34
1.4 OBJETIVOS	35
1.4.1 Objetivo geral	35
1.4.2 Objetivos específicos	35
 CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS	 37
2.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS	39
2.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	39
2.3 ESTUDO 1: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO DE PALHA.....	39
2.3.1 Alterações histológicas induzidas pela inalação crônica de cigarro de palha.....	40
2.4 ESTUDO 2: EFEITO DA ERVA-MATE SOBRE A LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELO CIGARRO DE PALHA.....	41
2.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	43
 CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO DE PALHA E OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA SOBRE A HISTOARQUITETURA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO E HEPÁTICO	 45
3.1 RESULTADOS	47
3.2 DISCUSSÃO.....	53
3.2.1 Caracterização físico-química do cigarro de palha	53
3.2.2 Efeitos histológicos da exposição crônica ao cigarro de palha em diferentes tecidos.....	54
 CAPÍTULO IV – EFEITOS NUTRACÊUTICOS DO EXTRATO DE ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> ST. HIL.) NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO DE PALHA	 55
4.1 RESULTADOS	57
4.2 DISCUSSÃO.....	61
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	80

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese está organizada em cinco capítulos. O Capítulo I, na forma de introdução, apresenta uma justificativa referente à importância do estudo, uma revisão de literatura utilizando diversas fontes referenciais, principalmente artigos científicos em revistas nacionais e internacionais, e objetivos. No Capítulo II é apresentada a metodologia que foi utilizada para atender os objetivos. Os resultados e discussão estão apresentados nos dois capítulos subsequentes. No capítulo III estão apresentados os resultados e discussão referentes à caracterização química do cigarro de palha e os efeitos da exposição crônica sobre a histomorfologia do sistema respiratório e hepático. Os efeitos da erva-mate sobre as alterações histológicas e parâmetros de estresse oxidativo no pulmão causados pela exposição à fumaça de cigarro de palha estão apresentadas no Capítulo IV. Por fim, no Capítulo V estão apresentadas as considerações e conclusões gerais abrangendo o capítulo III e as referências bibliográficas utilizadas em toda a tese.

1.2 JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS (2015) o tabagismo é considerado uma epidemia de abrangência mundial que reflete uma das maiores ameaças à saúde pública. Apesar de ser considerada a maior causa evitável de morbidade e mortalidade, é responsável por uma a cada dez mortes no mundo, totalizando cinco milhões a cada ano, podendo atingir oito milhões até 2030 (OMS 2015). Como fator de risco isolado, o tabagismo é responsável por aproximadamente cinquenta doenças, como o câncer, doenças cardiovasculares, pulmonares, entre outras (Viegas, 2008). De acordo com a Pesquisa Especial de Tabagismo – PETab: Relatório Brasil (INCA 2015), no Brasil, o hábito de fumar é mais prevalente entre os homens (12,8%) do que entre as mulheres (9%) e a faixa etária de maior consumo está entre 45 e 54 anos (13,2%). Segundo INCA (2015), o consumo do tabaco mata 3 milhões de pessoas no mundo anualmente e estima-se que em 2030 hajam 10 milhões de mortes, das quais, 7 milhões ocorrerão em países em desenvolvimento. O número de brasileiros fumantes atinge seis milhões, porém vem decrescendo, de acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA), devido às campanhas de esclarecimento e contrárias ao tabagismo realizadas pelo Ministério da Saúde (INCA, 2015).

Dentre as diversas consequências geradas pelo tabaco sobre o organismo, o sistema respiratório é o que apresenta maior suscetibilidade (Domej et al., 2014). A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e o enfisema pulmonar têm o tabagismo como principal fator de risco, por promover um quadro inflamatório crônico das vias aéreas pulmonares e progressiva limitação de fluxo aéreo (GOLD, 2015), além do envelhecimento precoce das células do pulmão (Yao et al., 2012). Neste sentido, o quadro inflamatório e a alteração no estado redox celular encontrados na DPOC e no enfisema, embora sofram influência da genética para o desenvolvimento da doença (Viegas, 2008), são agravados pelo estímulo inflamatório crônico, levando a um acometimento de dano progressivo do parênquima pulmonar e consequências periféricas adicionais e severas (Barnes et al., 2014). Além disso, danos oxidativos podem ser provocados em diferentes estruturas celulares, tais como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos no DNA, que, quando não reparados, podem iniciar o processo de carcinogênese (Ceylan et al., 2006).

Os estudos apontam para os efeitos do tabagismo sobre o organismo de pessoas fumantes, entretanto, fumantes passivos também podem apresentar sintomas respiratórios por inalação de partículas e gases nocivos aos pulmões e apresentam um estado de saúde comprometido (GOLD, 2016). Os fumantes passivos somam hoje cerca de dois bilhões, portanto, estima-se que 50% da população mundial está exposta direta ou indiretamente à fumaça de cigarro de cigarro (OMS, 2015).

O tabaco é consumido em diferentes formas, porém os cigarros industrializados têm sido investigados na maioria dos estudos que visavam à caracterização físico-química (Mulcahy et al., 2009; Javadian, 2015), bem como os efeitos nocivos para a saúde (Almeida et al., 2014; Valavanidis et al., 2013; Gea et al., 2015; Huang et al., 2016; Nadruz et al., 2016; Bandiera et al., 2016), uma vez que é a forma mais predominante de uso do tabaco. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de doenças (CDC, 2010), a fumaça do cigarro industrializado possui mais de 7.000 substâncias tóxicas, tais como monóxido de carbono (CO), amônia, cetonas, formaldeído, acetaldeído, acroleína, alcatrão, nicotina, e mais de 70 substâncias cancerígenas, incluindo arsênio, níquel, benzopireno, cádmio e chumbo (Behera, 2014; quando inalada, a fumaça pode induzir mudanças na estrutura das células (Moreno-Gonzalez et al., 2013) e no estado redox pulmonar (Elsayed e Bendich, 2001; Gochman et al., 2007), resultando em inflamação e efeitos cancerígenos e mutagênicos no sistema respiratório (Milara e Cortijo, 2012; Barnes, 2014). Por outro lado, o cigarro de palha, é o segundo cigarro mais consumido no Brasil com uma taxa de prevalência

de 5,1% . Não há estudos na literatura que revelem suas características físico-químicas e seus efeitos sobre o sistema respiratório. (PETab 2008;INCA, 2011). Os estudos existentes em relação ao consumo deste cigarro verificou um risco de desenvolver bronquite crônica (Menezes, 1997) e causar câncer de boca em humanos (Niel, 2008).

Os tratamentos utilizados para reduzir os efeitos deletérios do cigarro consistem no uso de adesivos transdérmicos de nicotina, goma de mascar à base de nicotina e medicamento antidepressivo, os quais apresentam um papel bem definido no processo de cessação do tabagismo, minimizando os sintomas da síndrome de abstinência à nicotina e também, associado a estes, a abordagem cognitivo-comportamental (Reichert et al., 2008). Adicionalmente, diversas drogas ou compostos de origem vegetal têm sido utilizados a fim de reduzir os agravos gerados sobre a saúde. Neste sentido, o uso de antioxidantes tem sido amplamente recomendado para diversas doenças relacionadas ao tabaco na tentativa de reduzir a produção de radicais livres a partir de diversos estímulos (Valença et al., 2008; Lopes et al., 2013; Al-Awaida et al., 2014; Taguchi et al., 2015). Entre eles, a erva-mate tem recebido a atenção em estudos recentes devido à sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória (Lanzetti et al., 2008; Lanzetti et al., 2011). Embora esses efeitos antioxidantes já tenham sido parcialmente demonstrados em estudos anteriores em animais e em humanos (Ril et al., 2011; Moraes, 2009; Lanzetti, 2011; Teixeira, 2013; Gupta et al., 2016), ainda persiste uma lacuna científica e literária quanto os efeitos desses agentes sobre os efeitos produzidos pelo cigarro de palha.

A partir destes pressupostos, conhecer os constituintes químicos do cigarro de palha e compreender seus efeitos sobre o pulmão, bem como estudar possíveis alvos terapêuticos que possam minimizar tais efeitos, torna-se de grande relevância social e científica.

1.3 REFERENCIAL TEÓRICO

1.3.1 O tabaco e suas principais formas de consumo e efeitos sobre a saúde

O tabaco é um produto agrícola que apresenta diversos constituintes utilizados para a fabricação de diferentes tipos de cigarro. São gerados a partir de folhas de plantas do gênero *Nicotiana*, que absorve e retém elementos tóxicos presentes em adubos, fertilizantes e pesticidas (Meirelles, 2009). O consumo de qualquer derivado do tabaco, dentre eles o charuto, narguilé, folha de mascar, fumo de corda, cigarro industrial, cigarro de palha, entre outros, trazem elementos tóxicos quando inalados ou ingeridos mesmo em baixas concentrações, sendo prejudiciais à saúde (Kazi et al., 2009).

Charuto: constituído por rolo de tabaco envolvido em folha de tabaco ou em qualquer substância e não possui filtro (Baker et al., 2000). Segundo Serpejante (2013), o charuto não possui filtro e, dessa forma, intensifica os danos ao sistema pulmonar. Além disso, a folha utilizada no charuto é queimada ao sol, diferentemente dos cigarros industrializados, que são queimados em forno com altas temperaturas, alterando o pH da folha, aumentando a absorção da fumaça pela mucosa bucal. Conforme dados do INCA (2015), o charuto pode causar o vício, como os cigarros convencionais, pois a nicotina é rapidamente absorvida pela mucosa oral.

A fase particulada do charuto é possivelmente mais tóxica do que a fumaça do cigarro industrial, pois apresenta maiores concentrações de nitrosamina e também maiores níveis de alcatrão (INCA 2015). Iribarren et al. (1999), relataram que usuários de charuto têm 11 vezes mais riscos de morte por câncer de pulmão quando comparados aos não fumantes. Adicionalmente, os usuários têm 45% de chance de desenvolver DPOC e 27% de apresentar doenças cardíacas (Franceschi et al., 1990; Muscat e Wynder, 1992). Os usuários apresentam também maior risco para outros tipos de câncer. A forma como o indivíduo fuma e a quantidade de cigarros estão diretamente relacionadas ao comprometimento das doenças pulmonares. Autores sugerem que um charuto poderia causar efeitos que se equivalem a um maço de cigarros contendo 20 unidades (INCA, 2015).

Narguilé: De origem oriental, um dispositivo para fumar, no qual o tabaco é aquecido e a fumaça gerada passa por um filtro de água antes de ser aspirada pelo fumante, por meio de uma mangueira (INCA, 2015). O fumo é queimado em um forninho e a fumaça é aspirada por uma mangueira até chegar à boca. A composição da fumaça do narguilé contém quantidades superiores de nicotina, monóxido de carbono, metais pesados e substâncias cancerígenas, diferentemente do cigarro industrial (Shihadeh e Saleh, 2005; INCA, 2016). De acordo com INCA (2011), 300 mil pessoas consumiam este tipo de tabaco no Brasil no ano de 2008 e o seu consumo tem crescido de forma acelerada entre os jovens.

Markowicz e colaboradores (2014) relataram que a fumaça do narguilé causa efeitos prejudiciais, como a liberação de vários hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, monóxido de carbono e altas frações de pequenas partículas (<200nm), comprometendo o sistema respiratório. Além disso, o volume de tragadas do narguilé pode chegar a 1.000 mL em uma sessão de uma hora, diferentemente do volume de tragadas do cigarro industrial, que alcança 30 a 50 ml entre cinco a sete minutos (Djordjevic et al., 2000; Shihadeh et al., 2004; INCA, 2016).

Folha de mascar: Ao contrário das outras formas de fumo, a folha deve ser mecanicamente esmagada com os dentes para a absorção dos constituintes, incluindo a nicotina, pela mucosa oral. Segundo Serpejante (2013), os níveis de zinco, chumbo e polônio são encontrados em maiores quantidades nessa forma de consumo, aumentando os riscos de desenvolver câncer, bem como a dependência à nicotina, por apresentar níveis elevados. Stanfill et al. (2011) avaliaram 53 produtos de tabaco oral *in natura* e verificaram uma variação de nicotina de 0,16 a 34,1 mg/g, pH de 5,2 a 10,1 e concentração de nitrosamina de 4,5 a 516.000 ng/g em cada produto.

Cigarro industrializado: O tipo de cigarro mais comum é o industrializado, com alto consumo no Brasil e no mundo (INCA, 2011). A fumaça possui uma mistura de 7.000 substâncias tóxicas, das quais mais de 70 cancerígenas (HHS, 2010). As substâncias tóxicas são absorvidas rapidamente pelos pulmões, passando pela corrente sanguínea e disseminadas para a periferia. Esse caminho feito pela fumaça é nocivo a vários órgãos e tecidos, principalmente ao sistema respiratório, pois ativa mediadores inflamatórios, o que contribui para o desenvolvimento de processos de lesão pulmonar, aumento de suscetibilidade às infecções e da chance de diferentes tipos de cânceres (Araújo et al., 2004). De acordo com Duarte et al. (2006), três substâncias destacam-se na composição química da fumaça do cigarro industrial: a nicotina, o monóxido de carbono e o alcatrão. Essas substâncias podem causar alteração na estrutura celular (Elsayed e Bendich, 2001) e no estado redox pulmonar (Gochman et al., 2007). Nosso grupo e outros centros de pesquisa têm demonstrado que o cigarro industrial pode levar à ativação de uma cascata de eventos bioquímicos, com uma resposta oxidativa pulmonar crucial para o desenvolvimento do quadro de enfisema (Araújo et al., 2004; Valença e Porto, 2008; Menegalli, 2009; Nesi et al., 2016; Frazer et al., 2013; Vij et al., 2016; Wong et al., 2016). Em conjunto, esses estudos têm apontado que os compostos da fumaça irritativos ou tóxicos podem ocasionar lesão ou morte celular de diversos tecidos por ocasionar um quadro de inflamação local e sistêmica, diminuição da capacidade de limpeza das vias aéreas, hiperplasia das células mucosas e excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN).

Cigarro de palha: O cigarro de palha produzido artesanalmente é constituído basicamente por uma porção de tabaco macerado envolvido por uma palha de milho, normalmente feito de forma manual pelo próprio usuário. Ainda não existem estudos científicos referentes à constituição química deste cigarro, tampouco sobre seus efeitos bioquímicos e moleculares no sistema respiratório. Até o presente momento, sabe-se que o cigarro de palha pode aumentar o desenvolvimento de bronquite crônica (Menezes, 1997) e câncer de cavidade oral (Niel et al., 2008). De acordo com INCA (2011), o cigarro de palha é o segundo cigarro mais consumido pela população brasileira, com 5,1%, apresentando maior concentração de usuários na zona rural, somente ficando atrás do cigarro industrial que é o mais procurado e consumido no país, com 14,4%, predominantemente nas zonas urbanas.

1.3.2 Alterações histopatológicas induzidas pelo tabaco

Os compostos da fumaça irritativos ou tóxicos podem ocasionar alterações na função e na estrutura do epitélio do trato respiratório (Calderón-Garcidueñas et al., 2001), causando lesão ou morte celular, inflamação da árvore brônquica, diminuição da capacidade de filtração das vias aéreas e outras alterações (Viegas et al., 2004). A inalação oral (Ogino et al., 1993) e/ou nasal (Chetan, 1993) da fumaça do cigarro promove uma profunda diminuição no transporte mucociliar *in vivo*, sendo a cotinina responsável por reduzir significativamente o batimento ciliar de células epiteliais *in vitro* (Agius et al., 1995). Em estudos com culturas de células epiteliais expostas à fase particulada da fumaça, verificou-se também diminuição dos batimentos ciliares (Cohen et al., 2009). Além de evidências *in vitro*, a exposição à fumaça de cigarro também prejudica o transporte mucociliar em humanos, tanto em exposições agudas (Bascom et al., 1995) quanto crônicas (Stanley et al., 1986; Karaman e Tek, 2009). Ainda, em humanos, o tabagismo interfere negativamente na evolução pós-operatória de cirurgia endoscópica do sistema respiratório superior (Small, 2003; Briggs et al., 2004; Smith et al., 2005).

A fumaça de cigarro também está associada a alterações nos mecanismos de produção de muco do sistema pulmonar. A exposição crônica provoca alterações metaplásicas da mucosa respiratória, com aumento no número e tamanho de células caliciformes e consequente aumento de secreção nas vias aéreas (Wright et al., 1984; Mullen et al., 1987). Estudos em animais têm demonstrado que exposições crônicas e intermitentes à fumaça do cigarro promovem alterações morfológicas no epitélio de todo o trato respiratório, desde hiperplasia, nas concentrações menores, até perda de cílios e metaplasia, nas concentrações maiores, além de espessamento e inflamação submucosa com infiltrado neutrofílico e de células inflamatórias mononucleares (Gaworski et al., 1998), comprometendo assim todo o sistema pulmonar.

Em estudos experimentais, observa-se que a fumaça de cigarro industrial causa alterações histológicas significativas nas vias aéreas de animais, causando hiperplasia e metaplasia escamosa do epitélio respiratório dorsal dos cornetos, hiperplasia basocelular e metaplasia escamosa da cavidade nasal, bem como a hipertrofia das células de Clara, incluindo efeitos carcinogênicos (Takahashi, 1985; Meyerinck, 1989; Dye e Adler, 1994). Da mesma forma, alguns estudos em fumantes confirmam os achados em animais, demonstrando alterações no epitélio respiratório, como aumento de epitélio desnudo (Wanner et al., 1996), maior prevalência de hiperplasia e atipias celulares e anormalidades ultraestruturais dos cílios (Auerback et al., 1961).

Todas as alterações funcionais e estruturais já citadas acima se correlacionam com as atividades de proteases/antiproteases no processo de enfisema induzido pela fumaça de cigarro, em que a teoria desse mecanismo se sustenta por uma resposta inflamatória crônica no trato respiratório inferior, onde as células inflamatórias liberam uma grande variedade de proteases que se sobrepõem às defesas antiproteolíticas, com subsequente degradação de tecido conjuntivo (Hoyt et al., 2003). A perda do recolhimento elástico e a evidência histológica de dano das fibras elásticas implicam, necessariamente, em degradação de elastina como um fator chave na patogênese do enfisema (Barnes, 2004). Estudos demonstram que após a inalação contínua de fumaça de cigarro, neutrófilos e macrófagos, juntamente com outras células, migram para o interstício pulmonar, produzindo ERO, lesando diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio vascular (Gerritsen et al., 2005; Sadowska et al., 2005). Adicionalmente, estudos também revelam que a relação entre a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a presença de seu receptor, VEGFR (Taraseviciene-Stewart e Voelkel, 2008), é um fator determinante no quadro de enfisema e nas mudanças estruturais no parênquima pulmonar decorrentes do consumo de tabaco. A deficiência de VEGF possui importante papel na patogênese do enfisema em animais (Suzuki et al., 2008), entretanto, níveis elevados podem comprometer a estrutura e função pulmonar (Hamada et al., 2005).

1.3.3 Estresse oxidativo e tabaco

Embora existam várias formas de consumo do tabaco, os estudos que relacionam a inalação da fumaça a partir do consumo e o efeito sobre estado redox celular estão concentrados no cigarro industrializado. Assim, devido à ausência de literatura sobre outros tipos de cigarro, os aspectos a serem apresentados, relacionados às consequências no organismo em decorrência da produção de EROs, decorrem de estudos neste tipo de cigarro. A fumaça do cigarro industrial contém altas concentrações de oxidantes (Rahman, 2005; Menget et al., 2006) e estima-se que a quantidade de radicais livres na fase gasosa esteja aproximadamente entre 10^{15} e 10^{18} na fase particulada, incluindo potentes oxidantes, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros radicais orgânicos (Tuder et al., 2006).

As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos e têm origem no metabolismo do oxigênio molecular. O oxigênio sofre redução univalente ou bivalente, com respectiva produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e que, dependendo do estado redox, produz a forma mais reativa e deletéria às biomoléculas, o radical hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 1999). As ERNs são moléculas também reativas que contêm nitrogênio e reagem facilmente com outras moléculas, como, por exemplo, o superóxido, formando peroxinitrito (Mak, 2008). Os mecanismos celulares envolvendo a produção das ERO e ERN são diversos. Embora a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria seja responsável pela maior quantidade de EROs em sistemas biológicos (Figura 1), a inflamação, mediada pela inalação da fumaça de cigarro, também promove significativa produção dessas espécies. Estudos demonstram que após a inalação contínua de fumaça de cigarro, macrófagos, neutrófilos e outras células migram para o interstício pulmonar, produzindo EROs ou ERNs adicionais, que lesam diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio (Gerritsen et al., 2005; Sadowska et al., 2005).

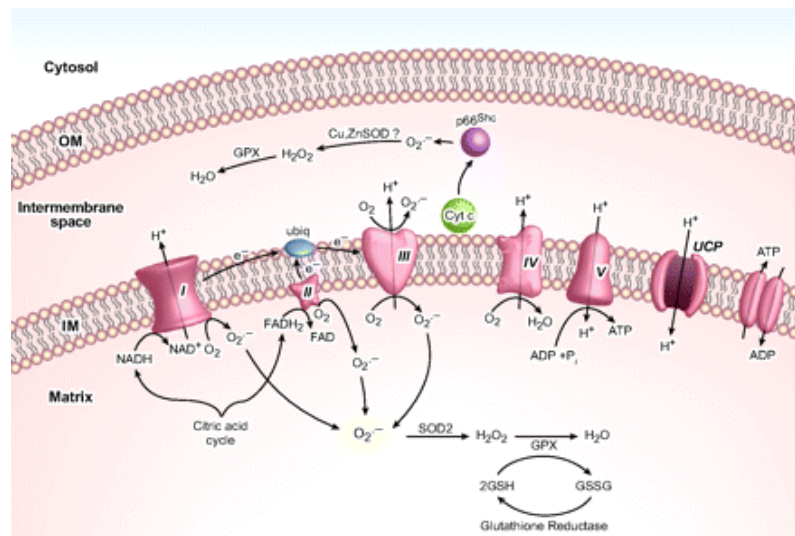


Figura 1: Espécies reativas de oxigênio na mitocôndria

Fonte: Lehninger et al., 2004.

A fumaça de cigarro, além de liberar ERO no trato respiratório, induz a quimiotaxia às células epiteliais, células endoteliais, macrófagos alveolares e células inflamatórias, que são a principal causa do estresse oxidativo e dano tissular associado a doenças pulmonares inflamatórias crônicas (Rajendrasozhan e Yang, 2008) (Figura 2).

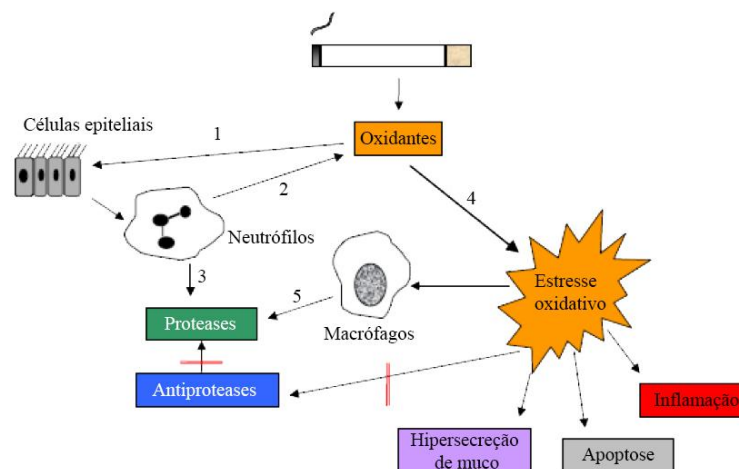


Figura 2. A fumaça de cigarro ocasiona um aumento da produção de oxidantes com consequência direta sobre as células epiteliais, gerando aumento do influxo e ativação de neutrófilos, que, por sua vez, aumentam ainda mais a produção de oxidantes. Esse aumento leva a um desequilíbrio entre proteases/antiprotease causando uma diminuição do sistema antioxidante e estabelecimento do estresse oxidativo. Juntos, o estresse oxidativo, a inflamação e ativação de vias apoptóticas contribuem para o aparecimento de doenças pulmonares.

Fonte: Adaptado de Healthy Lifestyle (2007).

Frente a esse quadro de estresse oxidativo nas doenças pulmonares relacionadas à inalação de partículas como a fumaça de cigarro, o sistema antioxidante também sofre consequências graves. Estudos demonstram que a fumaça de cigarro afeta o metabolismo da glutatona, aumentando os níveis de glutatona oxidada (GSSG) e diminuindo a glutatona reduzida (GSH), um importante sistema antioxidante pulmonar (Park et al., 1988; Reddy et al., 2002). O sistema pulmonar apresenta um sistema antioxidante ativo de combate à presença de ERO e ERN produzidos como uma resposta primária, contando com elevada atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e

glutathione peroxidase (GPX) (Halliwell e Gutteridge, 1999). As enzimas antioxidantes podem ser ativadas seletivamente durante a exposição à fumaça do cigarro e esse processo depende de alguns fatores, como quantidade de fumaça inalada, tipo de tabaco, quantidade de radicais livres produzidos e capacidade de defesa antioxidante do tecido (Syed et al., 2007). Elevadas concentrações de agentes oxidantes no pulmão diminuem a capacidade antioxidante, o que contribui para o dano às células epiteliais (Comhair e Erzurum, 2002; Aydin et al., 2015), favorecendo ainda mais a resposta inflamatória.

Contra a nocividade de compostos oxidativos celulares, antioxidantes provenientes das espécies vegetais têm sido propostos para amenizar os efeitos oxidativos no sistema pulmonar induzidos pela fumaça de cigarro (Flores et al., 2013; Das et al., 2013; Tan et al., 2014; Sticozzi et al., 2014). Diversos estudos têm demonstrado que o aumento da ingestão de antioxidantes na dieta e até a suplementação desses componentes pode otimizar a resposta endógena desse sistema e contribuir fortemente para a diminuição do comprometimento pulmonar frente à fumaça de cigarro. Extratos naturais ricos em antioxidantes, como a própolis (Lopes et al., 2013), açaí (de Moura, 2011 e 2012) e a erva-mate (Lanzetti, 2012), apresentaram resultados surpreendentes na histoarquitetura pulmonar de camundongos expostos à inalação crônica de fumaça de cigarro, demonstrando efeito terapêutico promissor.

1.3.4 Erva-Mate

A *Ilex paraguariensis* St. Hill (Aquifoliaceae) é uma espécie nativa da América do Sul conhecida como erva-mate, yerba mate, hierba mate ou, simplesmente, mate. É encontrada principalmente em três países: Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, apresenta maior produção nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Bracesco et al., 2011; Bastos et al., 2007).

A erva-mate na América do Sul foi descoberta e primeiramente utilizada pelos habitantes Guaranis nativos, de uma região que compreende Paraguai, Uruguai, norte da Argentina e Sul do Brasil na preparação de bebidas estimulantes ou devido a suas propriedades medicinais. A bebida pode ser conhecida como chimarrão no Brasil, servida com água quente em forma de chá, e tem um papel social bastante importante na população. Também é amplamente utilizada em todo o país como uma bebida gelada e muito comercializada. A Argentina é o primeiro exportador de mate, enquanto que o Uruguai tem o maior consumo (6-8 Kg/pessoa/ano), seguido pela própria Argentina (5 Kg/pessoa/ano) (Bracesco et al., 2011).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos, os quais são divididos em dois grupos metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários das plantas respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes, considerados essenciais à mesma, como as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (Reichert et al., 2008; Santos, 2004). Por sua vez, os metabólitos secundários apresentam distribuição restrita a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, estando intimamente associados às estratégias de defesa das plantas, envolvidos na produção de cor ou aroma que atraem insetos polinizadores ou animais que espalham seus frutos. Sendo compostos de elevada diversidade e abundantes no reino vegetal, têm despertado interesse de pesquisadores, os quais veem nos metabólitos secundários uma fonte promissora de constituintes químicos potencialmente úteis ao homem (Santos, 2004).

A maioria dos compostos bioativos comuns encontrados na erva-mate são metabólitos secundários, entre eles as saponinas, os compostos fenólicos e as metilxantinas (Burriss et al., 2012).

O extrato de erva-mate é rico em alcaloides, metilxantinas, flavonoides, vitamina A, complexo B, vitamina C e E, taninos, ácido Clorogênico (Bastos et al., 2007) e numerosos derivados de saponinas (Bastos et al., 2007; Heck e Mejia, 2007; Menini et al., 2007; Martinet et al., 2001). Autores ainda relatam que o teor de polifenóis na erva-mate é maior quando comparado com o vinho e chá verde, e que bebidas de erva-mate podem apresentar benefícios à saúde por otimizar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (Canterle, 2005; Gugliucci et al., 2009; Bixby et al., 2005).

Em vista disso, nos últimos anos houve um crescimento nas pesquisas relacionadas à erva-mate e suas propriedades antioxidantes, regulando diversos sistemas biológicos, como a capacidade de reduzir quadro de inflamação pulmonar causado pela fumaça de cigarro, atividade metabólica celular (Luz et al., 2016), redução dos parâmetros de estresse oxidativo (Lanzetti, 2011; Lanzetti, 2012; Colpo et al., 2016), efeitos antidepressivos (Ludka et al., 2016), acúmulo e oxidação de lipídeos, com diminuição do ganho de peso (Gao et al., 2013), propriedades de vasodilatação e efeitos antimutagênicos (Bracesco et al., 2011; Bastos et al., 2007; Heck e Mejia, 2007; Filip et al., 2010) como mostra a Figura 3.

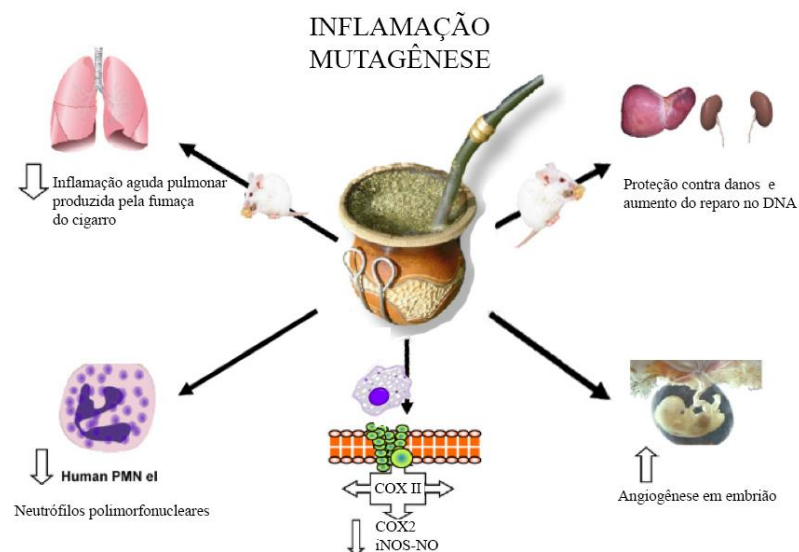


Figura 3: Efeitos biológicos da erva-mate.

Fonte: Bracesco et al. (2011).

Os pressupostos anteriormente abordados apontam para a necessidade de investigar as características físico-químicas presentes na fumaça de cigarro de palha, bem como a repercussão que uma exposição crônica à queima desse tipo de cigarro pode promover em diferentes tecidos. Adicionalmente, compreender o papel nutragênico e protetor do extrato da erva-mate sobre os efeitos que o cigarro de palha promove no pulmão pode apontar para uma estratégia preventiva e/ou terapêutica para quem dele faz o consumo. Contudo, o foco desse estudo também poderá contribuir para esclarecer a população que o cigarro de palha pode ser um tipo de tabaco tão prejudicial à saúde das pessoas quanto o cigarro industrial.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Caracterizar quimicamente o cigarro de palha e seus efeitos histopatológicos em diferentes tecidos, bem como verificar os possíveis efeitos nutragênicos do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) sobre as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e histoarquitetura pulmonar de animais expostos cronicamente ao cigarro de palha.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quimicamente os metais no fumo de corda (cigarro de palha), fumo industrial (cigarro industrial), na palha de milho e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no cigarro de palha e cigarro industrial;
- Analisar as propriedades térmicas (TGA) do fumo de corda, fumo macerado e/ou descascado e palha de milho;
- Analisar o teor de material particulado (MP) e monóxido de carbono da fumaça do cigarro de palha, cigarro industrial e cigarro de seda;
- Avaliar as alterações histológicas no pulmão, traqueia e fígado de animais submetidos à exposição ao cigarro de palha e ao cigarro industrial;
- Avaliar os efeitos do extrato de erva-mate sobre o balanço redox no pulmão de animais expostos à fumaça do cigarro de palha e cigarro industrial;
- Avaliar os efeitos do extrato de erva-mate sobre os danos oxidativos proteicos e níveis de glutatona no pulmão de animais expostos à fumaça do cigarro de palha e cigarro industrial;

- Avaliar os efeitos do extrato de erva-mate sobre a produção do conteúdo de metaloproteinases de matriz e secreção de VEGF no pulmão de animais expostos à fumaça do cigarro de palha e cigarro industrial.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei nº 11.794/08 (DOU 196, seção 1, outubro/2008) e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo 080-2014-01 e Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, 023/PIA/2011.

2.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A descrição metodológica a seguir está dividida em dois estudos. O primeiro estudo (estudo 1) foi realizado com o objetivo de caracterizar quimicamente o cigarro de palha e de verificar os possíveis danos provocados no pulmão, traqueia e fígado a partir de um modelo experimental de inalação à fumaça de cigarro. Utilizando um modelo experimental similar ao mencionado anteriormente, o segundo estudo (estudo 2) teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) sobre as alterações histopatológicas e bioquímicas no pulmão.

2.3 ESTUDO 1: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO DE PALHA

A Confeção do cigarro de palha: o fumo e a palha de milho foram adquiridos junto a agricultores na cidade de Severiano de Almeida/RS, Brasil. Inicialmente, as folhas de fumo foram enroladas em corda, descascadas, maceradas e expostas em prato de porcelana para ocorrer uma pré-secagem e temperatura ambiente. Para a confecção artesanal de cada cigarro foram utilizados 0,8 gramas de fumo seco enrolado pela palha de maneira uniforme. A quantidade de fumo utilizada é equivalente ao fumo presente no cigarro industrial.

Análise hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): Os HPAs foram analisados em fumo de corda via cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM). O método empregado para a determinação dos HPAs foi EPA 8270D, que avalia compostos orgânicos semivoláteis por cromatografia gasosa / espectrometria de massa (CG / EM). A análise de GC-MS foi realizada com um Modelo Agilent - 7890A equipado com um injetor de separação e uma coluna ultra inerte 5MS - Agilent (30m x 0,25mm x 0,25µm). O programa de temperatura do forno do GC foi de 60° C por 1 min. Foi aquecido a 225° C por 30° C min⁻¹. Então, foi aquecido a 10° C min⁻¹ até 285° C. O gás hélio foi usado como um transportador (fluxo constante de 1 mL min⁻¹). O espectrômetro de massa *Ion Trap* - Modelo Agilent: 240 Ion Trap MS foi operado no modo de ionização de elétrons com verificação completa (50 a 450 m / z). O *Ion Trap* e a linha de transferência de temperaturas foram fixadas em 210° C e 290° C, respectivamente.

Análise de metais: As amostras foram moídas em moinho criogênico (Spex 6750 Freezer Mill, EUA) e digeridas no ácido da seguinte forma: 200 mg de amostra foram pesadas e transferidas para o frasco de politetrafluoretileno (PTFE) (Tecnal, Brasil), no qual 3 ml de HNO₃ foram adicionados e a mistura repousou durante a noite. Subsequentemente, o frasco foi fechado com uma tampa de rosca e colocado num bloco de aquecimento (Tecnal, Brasil) a 90° C por 4 h. Após este período, a mistura esfriou à temperatura ambiente. A seguir, 1,5 ml de H₂O₂ foram adicionados e a mistura foi novamente colocada no bloco de aquecimento por 4 horas a 160° C. Em seguida, a solução obtida foi deixada para esfriar à temperatura ambiente e foi transferida quantitativamente para um frasco volumétrico de polipropileno, onde o volume da solução foi ajustado para 20 ml com o uso de água.

Análise das propriedades térmicas: As propriedades térmicas foram obtidas por Análise Termogravimétrica (TGA), utilizando um analisador da marca Shimadzu com um módulo TGA-50. Nos ensaios foram usadas massas de aproximadamente 8 mg, cadinho de platina, atmosfera inerte de nitrogênio de 30 mL min⁻¹, com taxa de aquecimento de 10° C min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25 a 1000 °C. Os resultados foram expressos por meio das curvas de TGA, apresentando a porcentagem de decomposição e função da temperatura.

Análise do teor de material particulado (MP): O cigarro industrial (n=3), cigarro de palha (n=3) e cigarro em colomin (controle, n=3) foram previamente pesados. O teor de material particulado foi determinado gravimetricamente pela diferença de peso entre o filtro limpo e o filtro incorporado com material particulado e analisado comparativamente com a massa e a queima do cigarro. Para a queima, os

cigarros foram acoplados em seringa contendo no fundo um filtro de material polimérico sintetizado, previamente pesado (Figura 1A). A seringa foi acoplada a uma bomba de vácuo (-300 mmHg). Considerando a estrutura do cigarro queimado (Figura 1B), o sistema foi desligado e o cigarro queimado e filtro foram recolhidos e submetidos a uma nova etapa de pesagem (Figura 1C).

Análise do monóxido de carbono (CO): O teor de monóxido resultante da queima dos cigarros (industrial e de palha) foi determinado usando um medidor de CO digital portátil C-3000 (Instrutherm, Brasil). A fumaça de cigarro foi inalada e armazenada em uma garrafa PET de refrigerante, de 2 L. O volume interno útil do recipiente (medido com água) foi de aproximadamente 1,3 L. Uma seringa de 10 mL foi fixada na parte inferior da garrafa onde os cigarros foram queimados. O conteúdo de monóxido de carbono foi mensurado usando o analisador de CO fixado no interior da garrafa (Figura 2A e 2B).

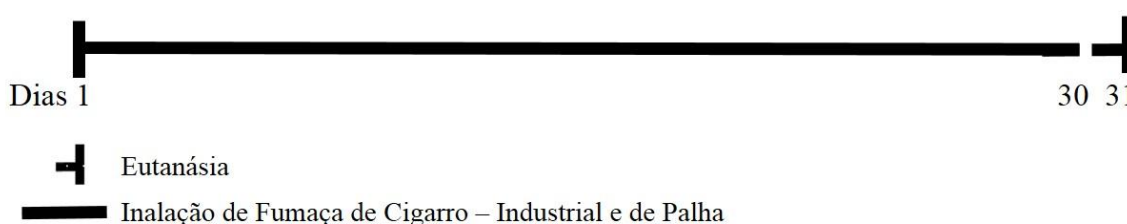
2.3.1 Alterações histológicas induzidas pela inalação crônica de cigarro de palha

Amostra: Foram utilizados 18 camundongos Swiss, machos, com peso de aproximadamente 30 a 50 g. Os animais foram divididos em três grupos (n=6): controle; cigarro de palha (CP) e cigarro industrial (CI). Os animais foram mantidos em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada em 22 °C, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso a água e alimentação.

Protocolo de exposição à fumaça de cigarro: Os animais foram expostos ao cigarro comercial com filtro (Marlboro vermelho) ou cigarro de palha produzido artesanalmente. A exposição foi procedida usando quatro cigarros por sessão alocados em uma câmara de inalação de acrílico (40x30cm por 25cm de altura), dentro de uma capela de exaustão, três sessões/dia, sete dias/semana, totalizando 30 e 60 dias de exposição. Os cigarros foram acoplados a uma seringa de plástico de 60 mL para captação da fumaça e imediatamente expelida dentro da caixa. Os animais foram expostos à fumaça do cigarro durante 6 minutos seguidos. Pela remoção da tampa da caixa de inalação e com auxílio de um sistema de exaustão, a fumaça foi eliminada durante 1 minuto, seguido por nova exposição à queima do cigarro. Similarmente aos procedimentos anteriores, os animais controle foram mantidos dentro de uma caixa inalatória, porém, sem exposição à fumaça de cigarro. Vinte e quatro horas após a última inalação os animais foram eutanasiados e a traqueia, pulmão e fígado foram removidos para análises histológicas.

Procedimento de eutanásia e coleta de tecido: Vinte e quatro horas após o período de exposição ao cigarro, todos os animais foram anestesiados com Zoletil 50® e eutanasiados por deslocamento cervical. Foi procedida a reperusão dos tecidos com solução salina contendo 1% de nitrato de sódio e 2% de citrato de sódio, seguido por paraformaldeído a 4%. Após, a região torácica e supra abdominal foram abertas para a extração cirúrgica do pulmão, traqueia e fígado para análises histológicas.

Desenho Experimental



Análise histológica: A traqueia, pulmão e fígado foram removidos e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 10% (PFA) por 24 horas para posterior processamento histológico. A clivagem do material foi realizada mediante cortes específicos: transversal para a traqueia e o fígado e corte longitudinal para o pulmão. O material foi incluído em parafina e cortado em micrótomo obtendo-se cortes de 4µm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina (6%) e Eosina (2%) e, após o processo de coloração, as lâminas foram devidamente preparadas para aquisição das imagens e análise da histoarquitetura dos tecidos avaliados.

2.4 ESTUDO 2: EFEITO DA ERVA-MATE SOBRE A LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELO CIGARRO DE PALHA

Amostra: Quarenta e oito camundongos Swiss, machos, pesando aproximadamente 30 a 50 gramas foram utilizados nesse estudo e divididos em seis grupos: controle (n=9); Erva-mate 1% (EM, n=9), cigarro de palha (CP, n=9), cigarro industrial (CI, n=9), cigarro de palha + erva-mate 1% (CP+EM, n=9); cigarro industrial + erva-mate 1% (CP+EM, n=9). Os animais foram mantidos em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada em 22 °C, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso a água e alimentação.

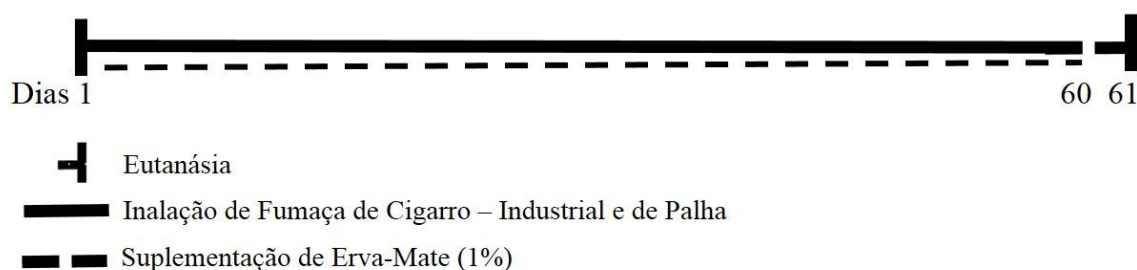
Coleta e preparação da erva-mate e cigarro de palha: As folhas de erva-mate foram coletadas aleatoriamente em um cultivo homogêneo, com coordenadas geográficas 27°37'15 "sul, 52° 22 '47" Oeste a 765 m de altitude (Barão de Cotegipe, Estado do Rio Grande do Sul). A colheita destas amostras foi realizada no mês de outubro de 2013. A planta da erva-mate *Ilex Paraguariensis* está registrada e armazenada no Herbário Padre Balduino Rambo (HPBR) da URI Campus Erechim sob o nº 11.931. As folhas foram secas a 35 °C em estufa com circulação de ar e trituradas. O material seco (5g) foi submetido a extração aquosa (200 mL) em soxhlet durante 6 horas, e os extratos foram liofilizados e armazenados para o preparo das soluções aquosas (Valduga et al., 2003). Os procedimentos de coleta de fumo e preparação do cigarro de palha foram descritos anteriormente (estudo 1).

Protocolo de exposição à fumaça de cigarro: O protocolo de exposição foi similar ao estudo anterior, excetuando o período total de exposição, que neste estudo foi de 60 dias consecutivos.

Administração da erva-mate: Durante os 60 dias de exposição ao cigarro, os animais receberam, concomitantemente, a erva-mate, na concentração de 1%, por gavagem. O preparo da erva-mate foi realizado semanalmente em água destilada e administrado 0,5 mL diariamente em temperatura ambiente.

Procedimento de eutanásia e coleta de tecidos: vinte e quatro horas depois da última exposição à fumaça, todos os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical e os pulmões direito de 6 animais por grupo foram cirurgicamente extraídos para posteriores análises. Uma porção do pulmão esquerdo foi homogeneizado em tampão específico e usada para análises de proteínas intracelulares por *immunoblotting*. O tecido foi homogeneizado em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm por 40 minutos, para remover materiais insolúveis. Com o sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford et al. (1976). O restante dos tecidos foi processado e armazenado no freezer a -70° C para análises bioquímicas. Os pulmões de três animais por grupo foram perfundidos com paraformaldeído 4% e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 10% (PFA) por 24 horas, para posterior processamento histológico. Os tecidos restantes dos animais foram acondicionados em saco branco leitoso e armazenados em freezer a -40° C, para posterior descarte e incinerados, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

Desenho experimental



Análise histológica: A clivagem do pulmão foi realizada seguida por cortes longitudinais. As amostras foram fixadas em parafina e recebeu cortes de 4µm de espessura feitos no micrótomo. As lâminas foram

coradas com hematoxilina (6%) e Eosina (2%) e, após o processo de coloração, foram devidamente preparadas para aquisição das imagens e análise da histoarquitetura pulmonar.

Balanco redox: A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ERO. A leitura de DCF foi realizada no fluorímetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão) e os resultados foram expressos em nmol de DCF por miligrama de proteínas (Wang e Joseph, 1999). A produção de óxido nítrico (ON) foi avaliada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro - Shimadzu) através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 min, seguido de leitura em 540 nm no espectrofotômetro. O conteúdo de nitrito foi calculado a partir da curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) - 0 a 100 nM. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína (Chae et al., 2004). Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com modificações. O conteúdo de GSH foi medido após a precipitação da proteína com ácido tricloroacético a 10%. Uma alíquota da amostra foi adicionada a um tampão de fosfato com 500 μM de DTNB. A reação da amostra entre o DTNB e os tióis foi lida no leitor de placas a 412 nm. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi utilizada para calcular os níveis de GSH nas amostras e os resultados foram expressos em nmol de GSH/mg de proteína.

Danos oxidativos em proteínas: Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonilas, baseados na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) como previamente descrito por Levine et al. (1990). Inicialmente, as proteínas foram precipitadas com adição de ácido tricloroacético (20%) e expostas numa reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Depois da reação, as amostras foram redissolvidas em ureia 8M e o conteúdo de carbonila foi determinado espectrofotometricamente em 370 nm usando um coeficiente de absorção de $22.000 \text{ Molar}^{-1}$. O conteúdo de tióis foi determinado pela redução do ácido ditionitrobenzoico por tióis presentes na amostra, lido espectrofotometricamente a 412 nm, conforme previamente descrito por Aksenov e Markesbery (2001). As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão PBS (7.4 PH) com 1 mM de EDTA e incubadas por 60 min, em temperatura ambiente, com 0,2 M de fosfato de potássio e 0,4% de ácido ditionitrobenzoico. O conteúdo de 3-nitrotorisina, utilizado como marcador de nitração proteica por peróxido nitrito foi determinada por *western blotting*, conforme procedimento descrito a seguir.

Matriz extracelular e produção de VEGF: Como marcador de alteração na matriz-extracelular foi avaliado o conteúdo de metaloproteinase 3 (MMP-3) por *western blotting* conforme procedimento descrito a seguir. O nível de VEGF foi determinado por meio de kits ELISA, de acordo com recomendações do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Conteúdo de proteínas por Western blotting: As proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT e, posteriormente, realizada a determinação do *imunoblot* com anticorpos específicos. Para isso, alíquotas contendo 250 μg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *BioRad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. As proteínas separadas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *BioRad*. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução de bloqueio (5% de albumina; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0,02% de Tween 20) por 2 h, à temperatura ambiente, a fim de reduzir a formação de reações inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários de anti-MMP-3, anti-3-nitrosirosina e anti- α -Tubulina (proteína endógena) sob agitação constante, *overnight* a 4° C. Posteriormente, foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 h à temperatura ambiente, seguido por 2 min em substrato enzimático (Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos da América) e expostas ao filme de RX em cassete de revelação auto radiográfica. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das auto radiografias reveladas por densitometria ótica (DO), utilizando *scanner* (HP 3400), com posterior processamento no *software Scion Image*® (Scion Corporation).

Quantificação de proteína Total: Os níveis de proteína total foram medidos em todas as amostras, utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976) baseado em curva padrão de albumina bovina (BSA

1mg/mL) e os valores foram utilizados para normalização dos dados referentes às técnicas bioquímicas e moleculares.

2.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A comparação entre os grupos no estudo 1 e histologia do estudo 2 foi realizada pelo teste de distribuição não paramétrica de Kruskal Wallis, seguido do Student-Newman-Keuls. Os demais parâmetros no estudo 2 foram apresentados em média \pm erro padrão da média e as diferenças entre os grupos foram determinados utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey ou teste t de Student, quando apropriado; um valor $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas.

CAPÍTULO III
RESULTADOS E DISCUSSÃO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO DE PALHA E OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO
CRÔNICA SOBRE A HISTOARQUITETURA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO E HEPÁTICO**

3.1 RESULTADOS

Em relação aos resultados da caracterização do cigarro de palha e o dano causado no pulmão, traqueia e fígado nos animais expostos a fumaça durante 30 dias de exposição, verificou-se significativos resultados, descritos a seguir, e que demonstram as razões pelas quais a inalação do cigarro de palha pode ser um agente capaz de levar prejuízos na histioarquitetura de diferentes tecidos e comprometer a saúde daqueles que dele fazem uso contínuo. Na caracterização química e danos histológicos, as análises do cigarro de palha são confrontadas com o controle ou com o cigarro industrial, considerado nesse estudo um controle positivo.

Compostos metálicos: Os teores metálicos encontrados no fumo em corda (cigarro de palha), fumo industrial (cigarro industrializado) e na palha de milho encontram-se apresentados na Tabela 1. Os resultados mostram que ambos os fumos tiveram composição metálicas com comportamento semelhante, apresentando teores maiores que 60 µg/g para os elementos Fe e Mn. O fumo industrial, com 212 ± 16 µg/g, apresentou uma concentração de Mn $\cong 3,4$ vezes superior à observada para o fumo de corda ($62,8 \pm 23,1$ µg/g). Em relação aos demais elementos, a maioria deles (As, Cd, Co, Pb e Se) aparecem em concentrações inferiores a 1,0 µg/g, sendo que os mesmos aparecem em maior quantidade no fumo industrial. Os elementos Cr, Ni e Sn aparecem com concentrações intermediárias ($> 1,0$ e $< 7,0$ µg/g), com o estanho (Sn), com $6,87 \pm 1,69$ µg/g, apresentando para o fumo em corda uma concentração $\cong 2,3$ vezes superior à observada para o fumo industrial ($2,95 \pm 0,35$ µg/g). Todos os elementos identificados nos fumos aparecem também na palha de milho, sendo que Mn, Fe e Sn apresentam concentrações $> 10,0$ µg/g.

Tabela 1. Análise dos metais identificados no fumo em corda (cigarro de palha), fumo industrial (cigarro industrializado) e palha de milho.

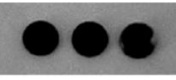
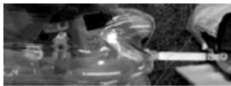
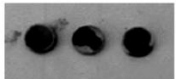
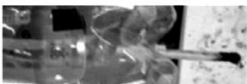
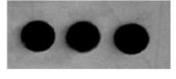
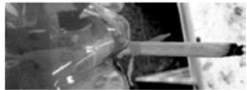
Metais	Limite de detecção	Palha de Milho (µg/g)	Cigarro industrializado (µg/g)	Fumo em Corda (µg/g)
As	0.02	0.02 ± 0.001	0.16 ± 0.03	0.08 ± 0.02
Cd	0.000	0.01 ± 0.001	0.59 ± 0.05	0.73 ± 0.25
Co	0.00	0.017 ± 0.00	0.969 ± 0.09	0.47 ± 0.16
Cr	0.38	0.56 ± 0.08	1.80 ± 0.69	0.95 ± 0.32
Cu	0.03	1.83 ± 0.14	13.9 ± 1.1	15.9 ± 5.1
Fe	4.05	16.9 ± 0.6	490.2 ± 131.2	486.7 ± 84.3
Mn	0.06	23.9 ± 5.9	212.0 ± 16.1	62.8 ± 23.1
Ni	0.03	0.33 ± 0.19	2.22 ± 0.10	1.74 ± 0.54
Pb	0.02	0.12 ± 0.02	0.47 ± 0.13	0.20 ± 0.06
Se	0.31	0.031 ± 0.027	0.82 ± 0.03	0.08 ± 0.02
Sn	0.15	11.6 ± 0.3	2.95 ± 0.35	6.87 ± 1.69

Presença de metais no fumo de corda (cigarros enrolados à mão), fumo processado (cigarros industrializados) e de palha de milho. As = arsênio; Cd = cádmio; Co = cobalto; Cr = crômio; Cu = cobre; Fe = ferro; Mn = manganês; Ni = níquel; Pb = chumbo; Se = selênio; Sn = estanho.

Monóxido de carbono e material particulado: O teor de monóxido de carbono (CO) gerado na queima de diferentes tipos de cigarro (industrial, palha e com papel de seda) é apresentado na Tabela 2. O cigarro industrial e o cigarro envolvido em papel de seda apresentaram menor teor de monóxido de carbono (539 m/L, 706 mg/L, respectivamente) em relação ao cigarro de palha (1.945 mg/L). Para fins comparativos a massa de material particulado foi comparada com a massa de cigarro queimada. Em termos percentuais o cigarro de fumo em corda confeccionado com palha de milho, com 2,68%, foi o que gerou menor valor de MP em relação à massa de cigarro queimada. Na sequência, com 3,26% e 4,30%, aparecem o cigarro industrial e o fumo em corda confeccionado em papel de seda. A análise estatística demonstra que não houve diferença significativa entre o cigarro industrial e o fumo em corda com palha de milho. A diferença observada entre os dois cigarros confeccionados com fumo de corda foi vinculada ao invólucro empregado para suas confecções e a queima. No cigarro preparado com palha de milho, a queima não foi uniforme, queimando mais rapidamente a palha que serve de invólucro e é a responsável pela sustentação da estrutura do cigarro. Quando sua queima chegou até a base do cigarro, o experimento teve que ser abortado (Figura 1b). A elevada contribuição da massa da palha ($0,369 \pm 0,065$ g), $\cong 30$ %, em relação a massa do cigarro ($1,145 \pm 0,086$ g), associada a sua queima mais rápida em relação ao fumo, proporcionou uma perda de massa significativa sem se converter proporcionalmente em MP, mascarando assim os resultados deste ensaio. Para

os outros dois ensaios (cigarro industrial e cigarro de fumo em corda com papel seda) a queima dos cigarros foi mais homogênea e a contribuição da massa do invólucro não foi significativa em relação a massa dos cigarros, permitindo assim uma melhor correlação entre o fumo queimado e o MP. Neste contexto pode-se observar que o cigarro com fumo em corda, com 4,30%, gerou maior teor de material particulado (MP) que o cigarro industrial, com 3,26%.

Tabela 2 - Resultados referentes aos teores de Material Particulado (P.M.) e monóxido de carbono.

Parâmetros Avaliados					
Amostra	Massa do Cigarro (g)	Massa Queimada (g)	Fotos dos filtros	CO (mg/L)	Analizador de CO (2A, 2B and 2C)
Cigarro Industrial	0.962 ± 0.044	0.525 ± 0.079		539	
Fumo em corda / papel seda**	0.714 ± 0.028	0.324 ± 0.062		706	
Fumo em corda / palha de milho***	1.145 ± 0.086	0.565 ± 0.108		1945	

Análise do conteúdo de monóxido de carbono (CO) durante a combustão dos cigarros (industrializado, de palha de milho, e enrolado pela própria pessoa, $n = 3$), utilizando um medidor de CO digital portátil, modelo C- 3000 (Instrutherm, Brasil) e garrafa PET. Os dados foram apresentados com média \pm desvio padrão. Diferenças entre os grupos foram determinadas pela análise de um fator (uma via) de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

* Para a análise do teor de material particulado os ensaios foram efetuados em triplicata.

** A massa do papel seda ($0,071 \pm 0,002$ g) corresponde a $\cong 10$ % da massa do cigarro.

***A massa da palha ($0,369 \pm 0,065$ g) corresponde a $\cong 30$ % da massa do cigarro.

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): Conforme observado na Tabela 3, não houve diferença estatística nos HPAs encontrados no cigarro de palha em relação ao cigarro industrial. Dentre os 16 tipos de HPAs somente o naftaleno, fluoreno e o pireno apresentaram concentrações acima do limite de detecção em ambos os tipos de cigarro analisados.

Tabela 3: Análise dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Amostras	Parte Líquida		
	Naftaleno	Fluoreno	Pireno
Cigarro Industrial (Marlboro Vermelho)	11 ppb	2.2 ppb	0.46 ppb
Cigarro de Palha	22 ppb	2.5 ppb	0.30 ppb

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) na porção líquida da combustão dos cigarros (industrializado e de palha de milho, $n = 3$) usando uma máquina específica. As análises dos HPAs foram feitas a partir da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os dados foram apresentados com média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio do Teste t de Student. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Análise térmica do fumo de corda (TGA): As propriedades térmicas do fumo em corda foram avaliadas por Análise Termogravimétrica (TGA). A Figura 4 apresenta os termogramas referentes ao fumo em corda (pedaços) e descascado (macerado) e palha de milho (inserte). Os termogramas das amostras de fumo apresentam uma perda contínua de massa até 850°C . Observam-se três regiões de perda de massa, entre 50 e 120°C , entre 200 e 450°C e 700 e 850°C . Diferentemente do fumo, a palha de milho apresentou somente duas regiões de perda de massa, entre 50 e 100°C e 250 e 500°C . Entre as amostras de fumo foram observadas tendências distintas. A amostra de fumo descascado apresentou uma maior perda de massa, com $34,2\%$, em relação ao fumo em pedaço, com $12,5\%$, na primeira região (50 e 120°C). Na terceira região, o fumo em pedaço foi o que apresentou a maior perda de massa em relação ao fumo macerado/descascado.

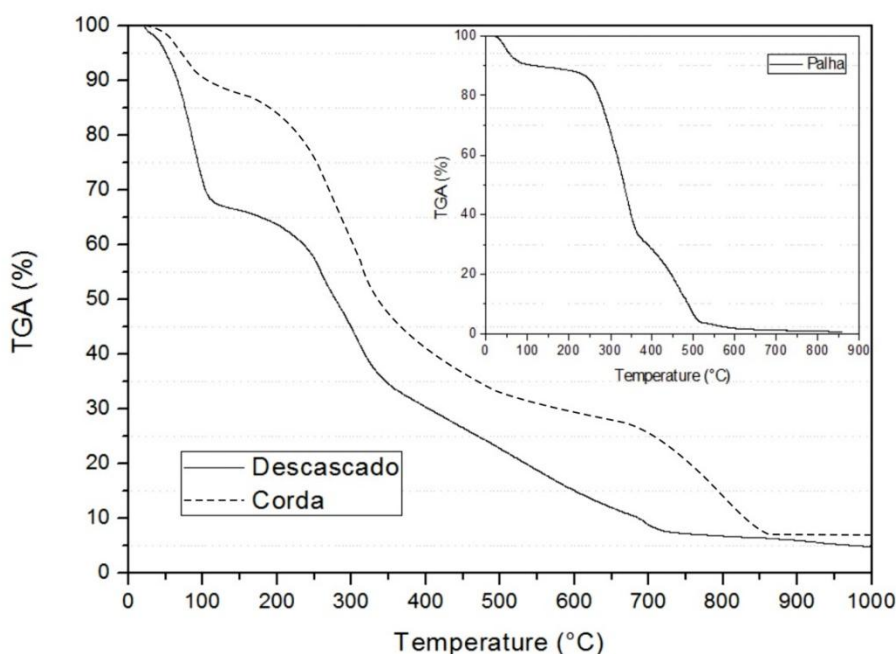


Figura 4. Propriedades térmicas de fumo de corda (em pedaço), do tabaco macerado/descascado e da palha do milho.

Análise histológica do tecido pulmonar: a figura 5 mostra um significativo aumento na destruição dos espaços alveolares nos animais expostos à fumaça de ambos os tipos de cigarros quando comparados com o grupo controle. Os animais expostos ao cigarro industrial apresentaram colapso alveolar enquanto que os animais expostos ao cigarro de palha mostram uma maior infiltração celular quando comparado com o grupo controle.

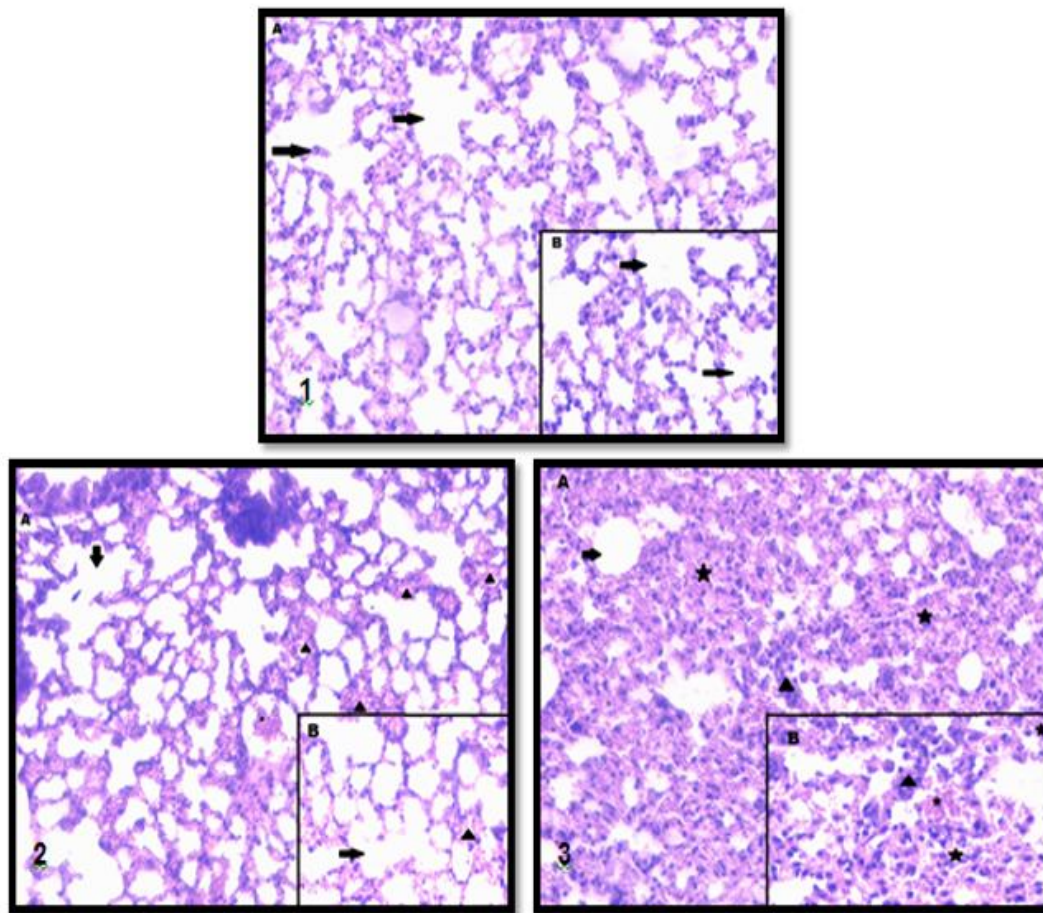


Figura 5. Fotomicrografia do tecido pulmonar (1) exposto ao ar ambiente mostrando os ductos alveolares normais (setas estreitas); exposto à fumaça do cigarro de palha (2): nota-se a destruição alveolar (setas) com a destruição de septos alveolares, além da presença de infiltração celular (ponta da seta); exposto à fumaça do cigarro industrial (3), encontra-se destruição alveolar (setas); presença de infiltração celular (ponta da seta) e as intensas áreas de atelectasia (estrela). A e B - H.E., 10 e 25x, respectivamente.

Análise histológica da traqueia: Na figura 6 observa-se metaplasia das células epiteliais da traqueia em ambos os grupos, cigarro de palha e cigarro industrial. Observou-se, ainda, alteração no epitélio da traqueia para pseudoestratificado cúbico pavimentoso, o que demonstra uma proliferação anormal de células e a ausência dos cílios, principalmente no grupo do cigarro industrial. Também foram observados aumento de tamanho e volume das células caliciformes nos animais expostos ao cigarro de palha.

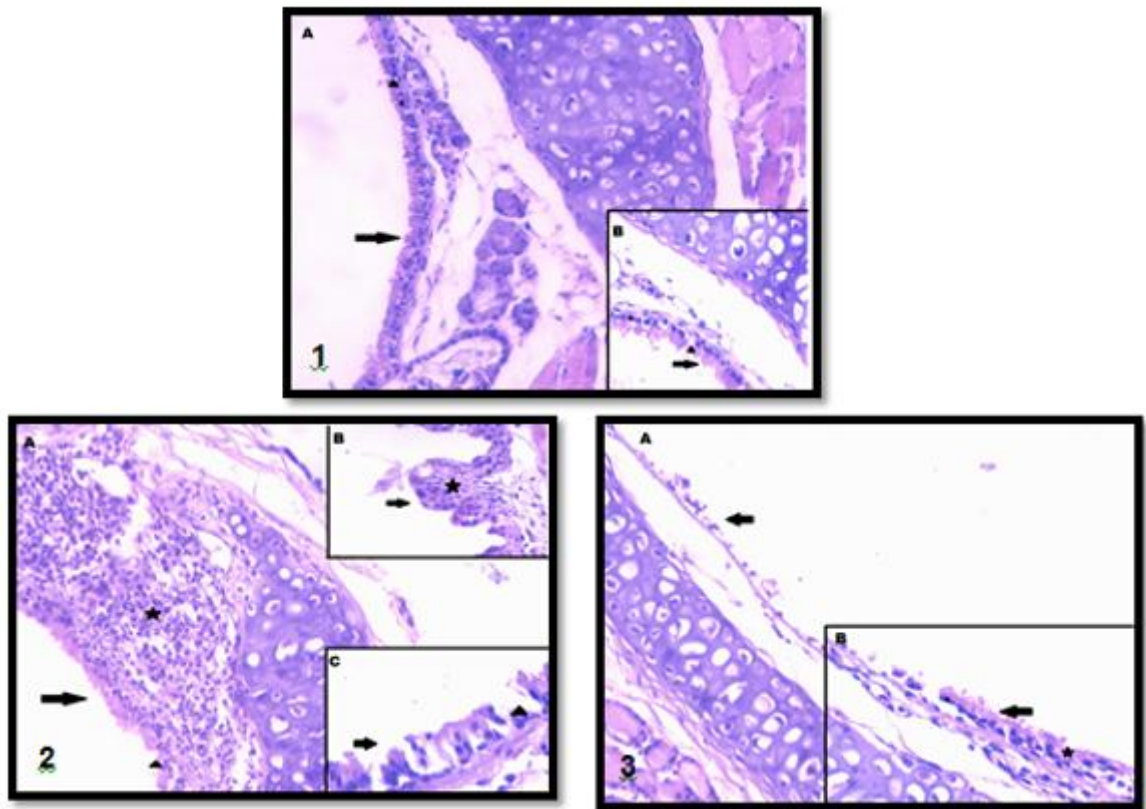


Figura 6. Fotomicrografia da traqueia (1) exposto ao ar ambiente mostrando epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado de aspecto normal (seta) e células caliciformes (ponta da seta); exposto à fumaça do cigarro de palha (2): nota-se intensa alteração morfológica no epitélio ou metaplasia (estrela e seta); alterações das células caliciformes (ponta da seta); exposto à fumaça do cigarro industrial (3), encontra-se alteração morfológica no epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado e ausência dos cílios (estrela). A e B - H.E., 10 e 25x, respectivamente.

Análise histológica do tecido hepático: Na figura 7, observa-se alteração no epitélio para pseudo estratificado cúbico, pavimentoso, aumento significativo de células eosinofílicas e megalocitose, bem como infiltrado celular em ambos os grupos expostos aos cigarros. Os animais expostos ao cigarro de palha apresentaram ainda uma tumefação celular comparado com o grupo controle.

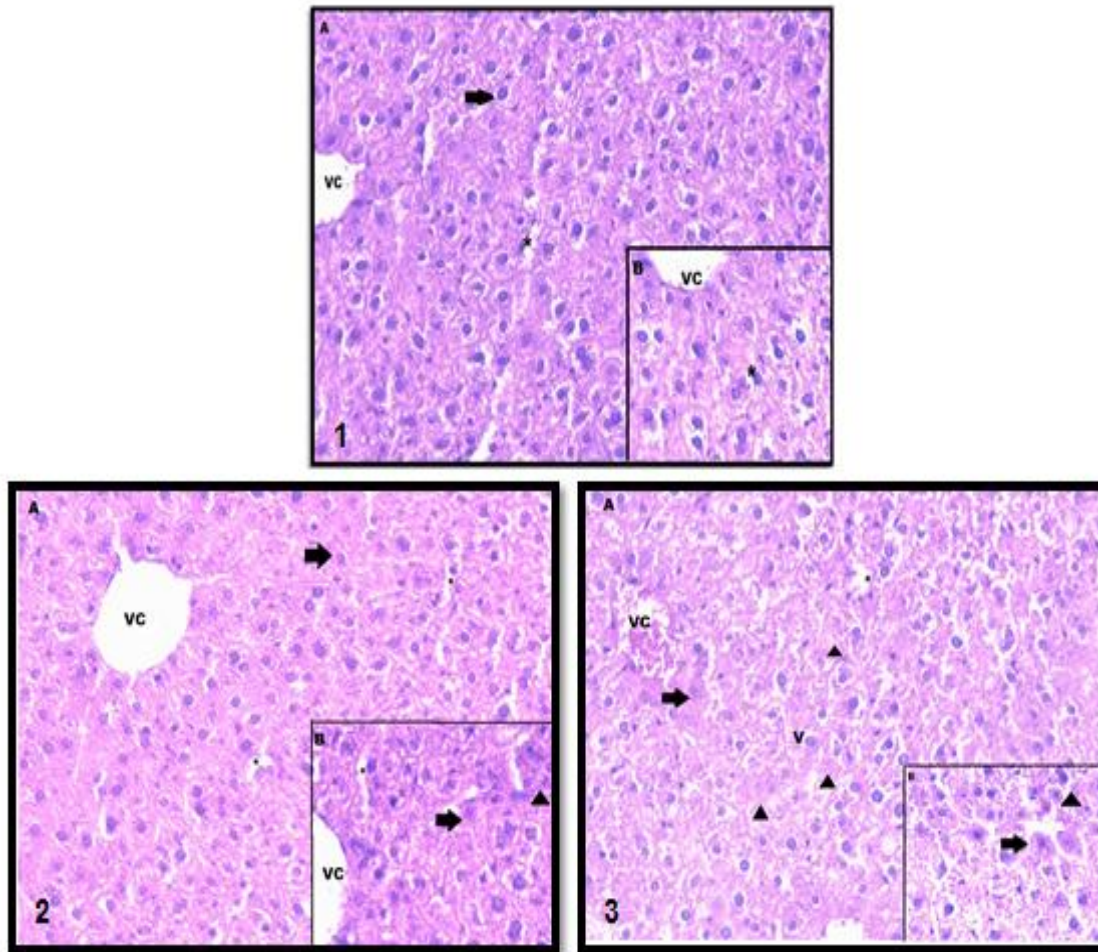


Figura 7. Fotomicrografia do tecido hepático (1) exposto ao ar ambiente mostrando os hepatócitos ao redor da veia centro lobular (VC) e capilares sinusoides (*) de aspecto normal; exposto à fumaça do cigarro de palha (2): nota-se intensa presença de eosinofilia citoplasmática hepática (seta) e de células inflamatórias (ponta da seta); exposto à fumaça do cigarro industrial (3), encontra-se a intensa presença de eosinofilia citoplasmática hepática (seta) e de células inflamatórias (ponta da seta), vacuolização citoplasmática (V) e dilatação sinusoide (*). A e B - H.E., 10 e 25x, respectivamente.

3.2 DISCUSSÃO

Os cigarros de palha são uma das várias formas de consumo de tabaco, no entanto, os seus efeitos nocivos à saúde humana permanecem inexplorados. Devido ao fato de não sofrer transformação industrial e de serem feitos à mão, os seus efeitos são equivocadamente considerados menos graves. No entanto, nossos resultados indicaram uma alta suscetibilidade de diferentes tecidos à fumaça de cigarros industrializados e de palha. Destacamos os efeitos deletérios de cigarros de palha, e nossos dados refutam a noção de que o simples fato de ser natural e artesanal o torne inofensivo à saúde.

3.2.1 Caracterização físico-química do cigarro de palha

A análise térmica da queima do cigarro representa as faixas de temperaturas onde ocorre perda de material por volatilização ou decomposição da composição do cigarro. Das três regiões de perda de massa observada, as regiões entre 50 e 120 ° C está vinculada à perda de umidade e de voláteis, enquanto que a segunda (entre 200 e 450 ° C) e a terceira região (entre 700 e 850 ° C) estão vinculadas a perdas de massa por volatilização e decomposição, respectivamente. Os perfis de decomposição térmica observados para as duas amostras de fumo, bem como suas tendências, estão coerentes com suas granulometrias. A etapa de maceração a que foi submetido o fumo em corda proporciona uma desagregação do mesmo, reduzindo sua granulometria, ou seja, o raio das partículas aumentando a área superficial de contato. Ambas as transformações físicas, além de facilitar a perda de água e voláteis promovem uma decomposição térmica mais eficiente (Bonelli et al., 2001), fazendo com que a mesma ocorra em menores temperaturas, resultando em uma menor perda de massa entre 700 e 850 ° C (Zanzi et al., 2002). Para a palha de milho (inserte da Figura 4) a segunda região de decomposição (entre 250 e 500 ° C) foi associada à decomposição dos polissacarídeos, como celulose, hemicelulose e lignina (Demirbas, 2004).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados em ambos os cigarros (Tabela 2), possuem propriedades cancerígenas que podem comprometer a estrutura e função e diversos tecidos, tais como do pulmão (Rengarajan et al., 2015). Os efeitos dos HPAs sobre a saúde humana estão diretamente associados ao mecanismo de contaminação que ocorre principalmente através da inalação de aerossóis atmosféricos, como a fumaça de cigarro, onde os HPAs encontram-se principalmente adsorvidos ao material particulado (Abrantes et al., 2009).

Para muitas das funções vitais do metabolismo humano, os constituintes inorgânicos são necessários, de modo que o excesso ou deficiência podem gerar desordem biológica no organismo. Os elementos chumbo e cádmio presentes no tabaco são particularmente tóxicos. No caso de cobalto, cobre e níquel, esses podem tornar-se altamente tóxicos se inalados como compostos de carbono, é o que ocorre durante o ato de fumar (Iwegbue et al., 2009). Os constituintes inorgânicos potencialmente tóxicos, encontrados em ambos os cigarros, são, possivelmente, oriundos da própria planta do tabaco, que os absorve através do solo como consequência da utilização dos pesticidas, fertilizantes e fatores ambientais. Adicionalmente, o processamento industrial do cigarro contribui substancialmente para as elevadas concentrações de metais encontrados no cigarro industrial (Almeida et al., 2014). Nesse sentido, os elementos químicos metálicos encontrados nos diferentes cigarros apresentam potencial de toxicidade ao organismo, pois, quando inalados, são carregados para a corrente sanguínea e acumulados no organismo em diferentes tecidos, como traqueia, pulmão e fígado, o que pode promover mutações no DNA e tumores em diversos tecidos do corpo humano (Viana et al., 2011; Caglieri et al., 2006; Plum et al., 2010).

Dependendo do tecido, a fixação de íons inorgânicos em níveis elevados promove alterações diferenciadas. Por exemplo, estudos demonstram que o cádmio se acumula em diversos órgãos do corpo e interfere diretamente nas reações químicas das células (Johnson, 2001). A toxicidade do Chumbo promove efeitos graves sobre o cérebro, rins, sistema nervoso e células vermelhas do sangue (Ashraf, 2012). O chumbo, presente no tabaco, tem sido associado a um comprometimento fetal e cerebral (Agbandji et al., 2012), enquanto que o níquel, absorvido nas plantas de tabaco pelo solo, apresentam potencial genotóxico (Huma et al., 2008), associado ao câncer de pulmão e cavidade nasal (Das et al., 2008). No trato respiratório, o arsênio, também proveniente da fumaça do cigarro, leva a problemas reprodutivos e câncer de pulmão. Adicionalmente, o cromo ataca o trato respiratório, causando dificuldades na respiração, tosse e diminuição da função pulmonar (Sobaszek et al., 2000; Caglieri et al., 2006).

Níveis elevados de CO, como observado na queima do cigarro de palha, promove aumento da carboxihemoglobina (Varisco, 2004; Melo et al., 2005; Torres, 2009; Jardim et al. 2010), a qual interfere diretamente na transferência de oxigênio para os tecidos e leva a hipoxemia em diferentes órgãos (Varisco, 2004). Os resultados obtidos no cigarro de palha decorrem possivelmente das características do fumo

(desagregação/granulometria) e da confecção do cigarro (compactação e invólucro), uma vez que o CO são produtos da queima incompleta do cigarro (De Luca e Rigatto, 1982). A partir da queima, uma alteração direta da granulometria do fumo e de sua compactação no interior do cigarro reduz a porosidade do cigarro, limitando o aceso do oxigênio (Varisco, 2004).

3.2.2 Efeitos histológicos da exposição crônica ao cigarro de palha em diferentes tecidos

De acordo com van der Vaart e colaboradores (2004) e Jacobsen e colaboradores (2011), a inalação da fumaça de cigarro ocasiona um processo inflamatório crônico das vias aéreas e do parênquima pulmonar e essas alterações são dependentes da quantidade de fumaça inalada e o tempo de exposição aos agentes tóxicos do cigarro (Dórea e Botelho, 2004). Os resultados mostram uma significativa suscetibilidade do pulmão aos agentes nocivos presentes tanto na fumaça do cigarro industrial quanto no cigarro de palha.

Um aumento na destruição dos espaços alveolares nos animais expostos à fumaça de ambos os tipos de cigarros foi observado e, ainda, os animais expostos ao cigarro industrial apresentaram colapso alveolar, enquanto que os animais expostos ao cigarro de palha apresentaram uma maior infiltração celular quando comparados com o grupo controle. Resultados similares foram observados por Valença e Porto (2008), em que animais expostos a 30 dias à fumaça de cigarro industrial apresentaram alterações da histoarquitetura pulmonar, com alargamentos dos espaços aéreos no ducto alveolar e alvéolos. Outros estudos, utilizando tempos diferentes de exposição ao cigarro industrial (Zheng, 2009; Gan et al., 2011) observaram respostas similares aos observados no presente estudo. Embora não haja na literatura informações quanto aos efeitos histopatológicos sobre o pulmão a partir do cigarro de palha, os resultados deste estudo sugerem um quadro de enfisema pulmonar (Stewart e Voelkel 2008; Morse e Rosas, 2014) que leva a um concomitante comprometimento estrutural e funcional do sistema respiratório (Alves et al., 2014).

No presente estudo, alterações histológicas na traqueia foram encontradas em animais expostos à fumaça do cigarro. Ambos os tipos de cigarros promoveram uma metaplasia das células epiteliais, bem como alterações no epitélio da traqueia para pseudoestratificado cúbico pavimentoso, o que representa uma proliferação anormal de células do epitélio e a ausência dos cílios. Resultados similares foram encontrados por Medeiros e colaboradores (2003), que observaram perda, assimetria e alongamento de cílios além de infiltrado inflamatório traqueal em um estudo com ratas expostas à fumaça do cigarro. Contudo, diferentemente do cigarro industrial, o cigarro de palha apresentou um aumento de tamanho e volume das células caliciformes. Além disso, uma substituição do epitélio pseudo estratificado cilíndrico ciliado por epitélio pseudo estratificado cúbico pavimentoso foi observado no grupo exposto ao cigarro de palha. O epitélio pseudo estratificado cilíndrico ciliado, conhecido por proteger a estrutura da traqueia a lesões oriundas da fumaça do cigarro nas vias aéreas de fumantes, quando alterado surgem alterações histopatológicas como hiperplasia secretória e hipertrofia (Duarte et al., 2006). Adicionalmente, a exposição crônica à fumaça provoca alterações metaplásicas da mucosa respiratória, com aumento no número e tamanho de células caliciformes, ausência de cílios e consequente aumento da secreção nas vias aéreas (de Souza, 2009; Tamashiro et al., 2009; Rufino e Costa, 2013).

O fígado é outro órgão altamente suscetível aos efeitos deletérios do cigarro. Os resultados encontrados no tecido hepático dos animais expostos à fumaça de ambos os cigarros, ocasionaram aumento de células inflamatórias e alterações nos hepatócitos, o que pode indicar a presença de toxicidade de ambos os cigarros. Essas alterações sugerem o início de um processo inflamatório que pode resultar em dano estrutural mais grave e posterior necrose tecidual do órgão com a contínua exposição ao agente agressor. Isso decorre provavelmente pelo fato do fígado ser um dos órgãos responsáveis pela detoxificação (Young e Heath, 2000).

A taxa em que o fígado pode eliminar as toxinas pode determinar a suscetibilidade à sobrecarga tóxica, que, por sua vez, pode levar a respostas inflamatórias e consequentes danos estruturais. Resultados similares foram observados por Czekaj e colaboradores (2002) em que ratas Wistar prenhas e não prenhas expostas a fumaça do cigarro que apresentaram aumento no número de hepatócitos, células eosinofílicas com núcleos picnócitos.

CAPÍTULO IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFEITOS NUTRACÊUTICOS DO EXTRATO DE ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL.) NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO DE PALHA

4.1 RESULTADOS

Os resultados, observados a seguir, demonstram um importante papel da erva-mate na modulação de parâmetros histopatológicos e na oxidação e reparo de proteínas constitutivas intra e extracelular no pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro de palha. Para atender os objetivos propostos nesse estudo, as análises dos grupos expostos ao cigarro de palha foram confrontadas com animais controles ou com animais expostos ao cigarro industrial, considerado nesse estudo como um controle positivo.

Parâmetros histopatológicos e quantificação de enfisema: a figura 8 demonstra as imagens de cortes longitudinais do tecido pulmonar corados com coloração de H&E. Na figura 8A, o tecido pulmonar de animais expostos ao ar ambiente apresenta uma histoarquitetura sem alterações histológicas. Porém, a imagem do parênquima pulmonar de animais expostos ao cigarro industrial (Figura 8B) demonstra a presença de áreas de alargamento alveolar (AA) e de espessamento de septo alveolar (ES). Na figura 8C o grupo exposto ao cigarro de palha apresentou áreas fibróticas (estrela preta), áreas de alargamento alveolar (AA) e hemorragia (seta preta). Os animais suplementados com erva-mate mostraram septos alveolares íntegros (seta preta, Figura 8D) similares ao controle. Os animais expostos à fumaça de cigarro industrial ou ao cigarro de palha e tratados com erva-mate demonstraram uma área alveolar íntegra (Figura 8E, seta preta) e uma diminuição da área fibrótica (Figura 8F, seta preta). A quantificação do enfisema foi determinada por estereologia, a partir do diâmetro alveolar médio. Como observado na figura 8G, o grupo CI apresentou aumento da área alveolar comparada ao AA, e o grupo EM+ CI diminuiu a área alveolar comparado ao CI. O grupo EM+CP por sua vez, também demonstrou diminuição significativa da área alveolar comparado ao grupo CP.

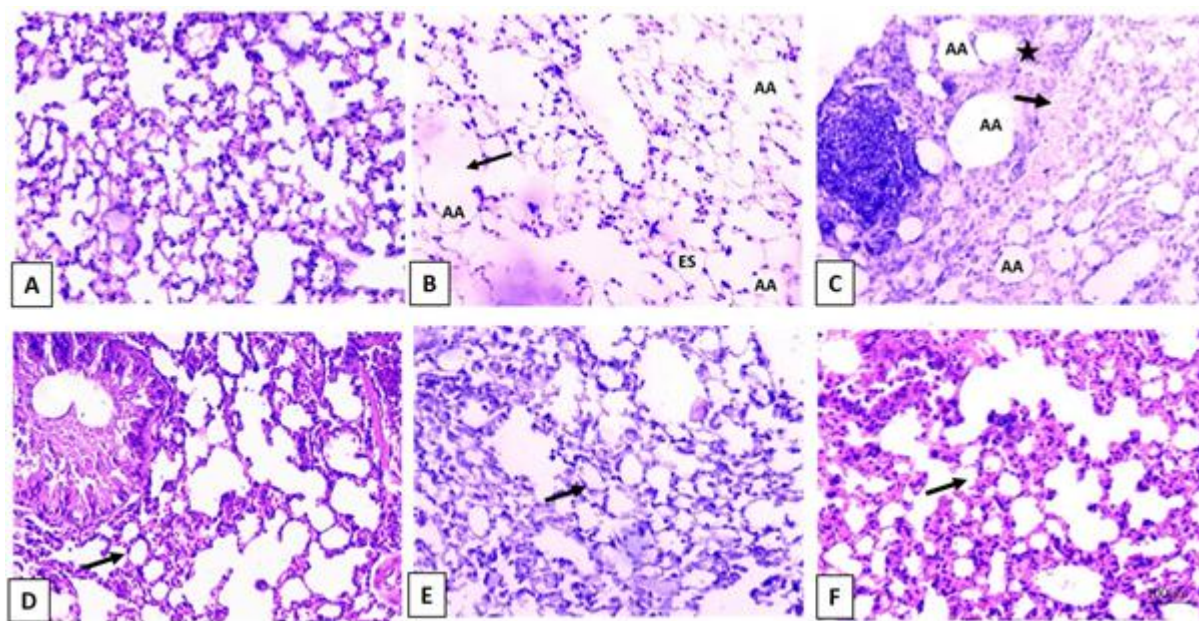


Figura 8G

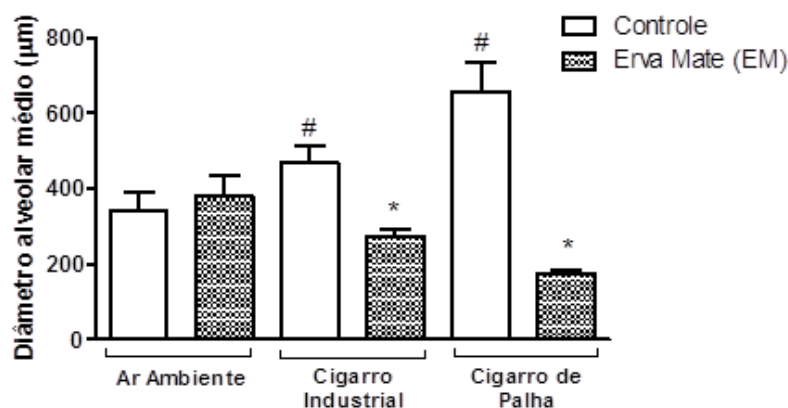


Figura 8: Imagens de cortes longitudinais do tecido pulmonar corados com coloração de H&E. A) Tecido pulmonar do grupo ar ambiente. B) grupo CI com áreas de alargamento alveolar (AA) e espessamento de septo alveolar (ES). C) grupo CP com áreas fibróticas (estrela preta), áreas de alargamento alveolar (AA) e hemorragia (seta preta). D) grupo EM com septos alveolares íntegros (seta preta). E) grupo EM + CI mostrando área alveolar íntegra (seta preta). F) EM + CP com diminuição da área fibrótica (seta preta). G) Quantificação estereológica do diâmetro alveolar médio (para a estereologia foi utilizado análise de Variância, ANOVA com post-test de Newman-Keuls, # é diferente do AA e * é diferente do controle, $p \leq 0,05$). $n = 3$ / por grupo. Aquisição de imagens em objetiva de 20x

Equilíbrio redox: Como observado na figura 9A, a produção de DCF, um produto da oxidação de 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) por espécies reativas de oxigênio, em especial o peróxido de hidrogênio, foi surpreendentemente aumentada no grupo exposto ao ar ambiente e suplementado com a erva-mate bem como nos grupos expostos ao cigarro industrial e de palha. Contudo, a suplementação de erva-mate nos grupos expostos a ambos os tipos de cigarro promoveu uma redução significativa nesses níveis. O nitrito, um produto final do metabolismo do óxido nítrico (ON), não teve seus níveis alterados pela exposição a ambos os tipos de cigarro ou pela suplementação de erva-mate, (Figura 9B) o conteúdo de glutatona foi significativamente aumentado na presença de erva-mate no grupo exposto ao ar ambiente bem como no grupo exposto ao cigarro de palha (Figura 9C).

Figura 9A

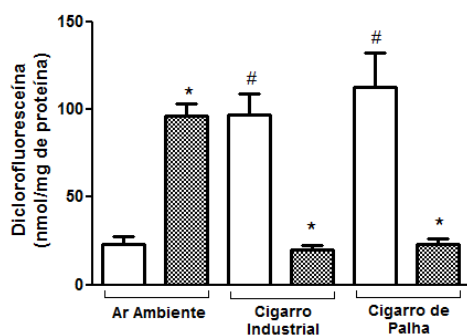


Figura 9B

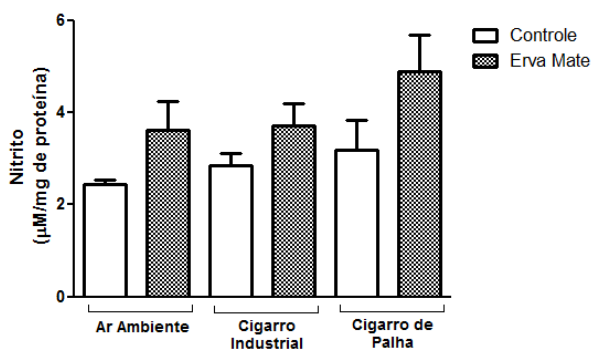


Figura 9C

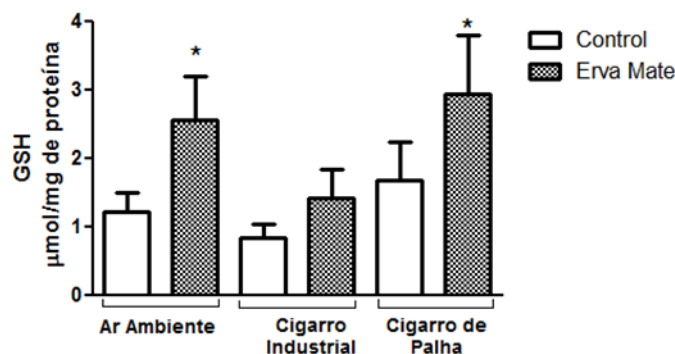


Figura 9 (A-C). Efeito da erva-mate sobre a produção de DCF (Figura 9A), nitrito (Figura 9B) e GSH (Figura 9C) no pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro industrial e de palha. Os dados estão expressos como média \pm e desvio padrão e tratados estatisticamente com análise de variância ANOVA de uma via e *post-hoc* de Newman-Keus considerando os grupos estatisticamente diferentes quando o valor de P for $\leq 0,05$. (* diferença em relação aos controles, # diferente em relação ao ar ambiente).

Danos oxidativos em proteínas: Os danos oxidativos em proteínas foram avaliados por diferentes métodos que quantificam processos de oxidação ou modificação de proteínas. Como observado na Figura 10A, a formação ou adição de grupos carbonílicos foram aumentadas em amostras de homogeneizado pulmonar nos grupos CP, CI e CI suplementado com erva-mate, em relação ao grupo exposto somente ao ar ambiente. Entretanto, animais expostos ao cigarro de palha suplementados com erva-mate apresentaram níveis reduzidos de carbonilação proteica comparados ao ar ambiente e ao respectivo controle. Os níveis de

tióis totais foram elevados em animais expostos ao ar ambiente e suplementados com erva-mate em comparação ao controle, entretanto, esses valores não foram alterados nos animais expostos aos diferentes tipos de cigarro (Figura 10B). Adicionalmente, o conteúdo de nitrotirosina, um produto da nitração de tirosina por espécies reativas de nitrogênio e considerado um marcador indireto de peróxido nítrico, foi elevado nos grupos expostos aos diferentes tipos de cigarro em relação aos animais expostos ao ar ambiente, entretanto esses valores foram significativamente reduzidos quando os animais foram suplementados com erva-mate (Figura 10C)

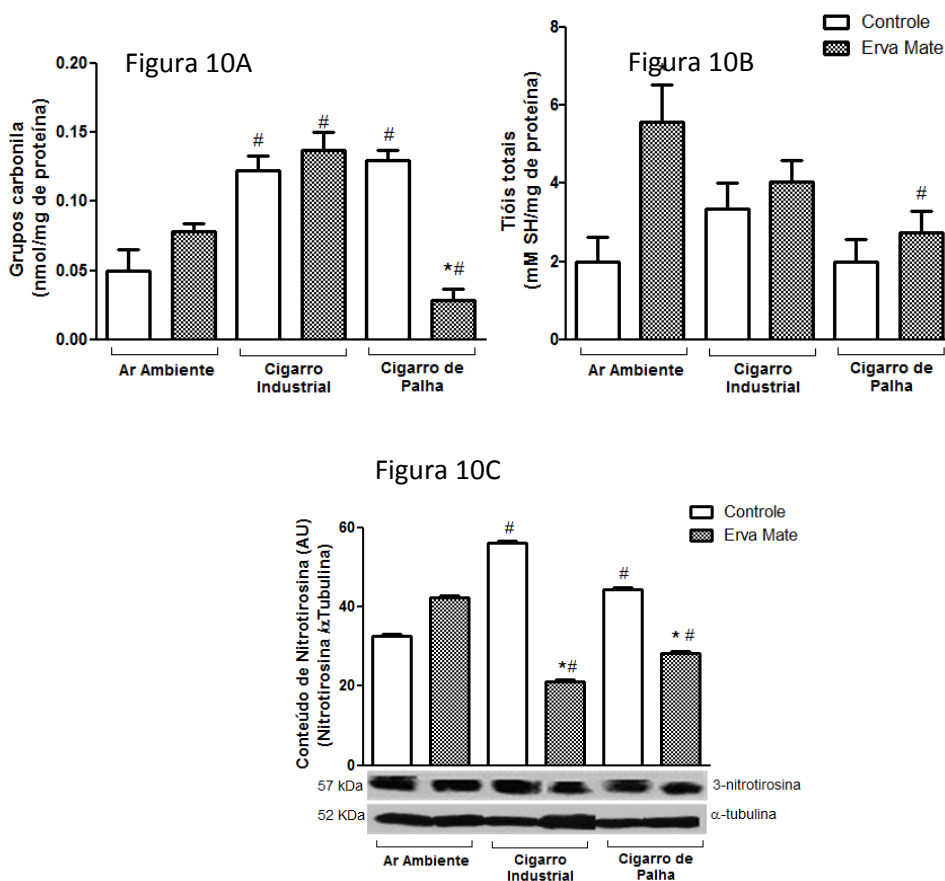


Figura 10 (A-C). Efeito da erva-mate sobre os níveis de proteínas carboniladas (Figura 10A), tióis totais (Figura 10B) e conteúdo de nitrotirosina (Figura 10C) no pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro industrial e de palha. Os dados estão expressos como média \pm e desvio padrão e tratados estatisticamente com análise de variância ANOVA de uma via e *post-hoc* de Newman-Keuls considerando os grupos estatisticamente diferentes quando o valor de P for $\leq 0,05$. (* diferença em relação aos controles, # diferente em relação ao ar-ambiente).

Matriz Extracelular e VEGF: A Figura 11A mostra que o conteúdo metaloproteinase-3 (MMP-3), uma importante protease da matriz extracelular, aumentou significativamente nos grupos CI e CP comparados ao exposto ao ar ambiente. Entretanto, a suplementação de erva-mate impediu que esses valores fossem alterados por ambos os tipos de cigarro. Como observado na Figura 11B, níveis elevados de VEGF foram observados somente no grupo exposto ao cigarro de palha, quando comparado ao ar ambiente, entretanto esses valores mantiveram-se em níveis de controle após a suplementação de erva-mate.

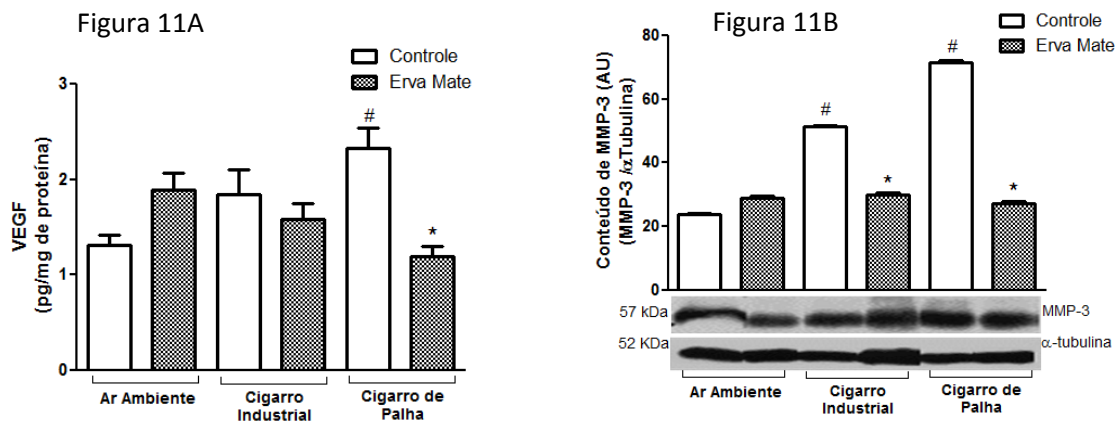


Figura 11 (A-B). Efeito da erva-mate sobre o conteúdo MMP-3 (Figura 11A) e VEGF (Figura 11B) no pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro industrial e de palha. Os dados estão expressos como média \pm e desvio padrão e tratados estatisticamente com análise de variância ANOVA de uma via e *post-hoc* de Newman-Keus considerando os grupos estatisticamente diferentes quando o valor de P for $\leq 0,05$. (* diferença em relação aos controles, [#] diferente em relação ao ar ambiente).

4.2 DISCUSSÃO

A fumaça gerada pela queima do tabaco apresenta propriedades mutagênicas, citotóxicas e pró-inflamatórias (Franceschi et al., 1990; Roemer et al., 2004; Yao et al., 2008; Rickert et al., 2011) que, quando inalada, promove diversos prejuízos celulares já relatados em vários estudos recentes (Smith et al., 2006; Stinn et al., 2010; Mladjenovic et al., 2014; Yeager et al., 2016). Entretanto, as consequências celulares a partir de alguns tipos de cigarro ainda são inconclusivas. Neste sentido, o cigarro de palha, por ser uma das formas de uso do tabaco mais utilizadas no Brasil, merece atenção científica, pois seus efeitos bioquímicos e moleculares nos sistemas orgânicos ainda são desconhecidos. Até o presente momento, apenas sabe-se que o cigarro de palha pode levar ao desenvolvimento de bronquite crônica (Menezes, 1997) e ao câncer de cavidade oral (Niel et al., 2008). Somados à escassez de estudos com cigarro de palha, as investigações que mostram a eficácia de agentes nutracêuticos sobre os efeitos deletérios do cigarro são também inconsistentes, particularmente relacionados ao cigarro de palha. Os resultados desse estudo demonstram claramente que o cigarro de palha (artesanal), assim como o cigarro industrializado, é potencialmente nocivo, e os efeitos bioquímicos e moleculares da inalação da fumaça são dependentes do tipo de cigarro em combustão. Adicionalmente, intervenções com a erva-mate concomitante a exposição à fumaça contribuem substancialmente para reduzir os danos celulares promovidos pelos diferentes tipos de cigarro (Lanzetti et al., 2008 e 2011).

Os resultados histológicos demonstram áreas de alargamento do espaço aéreo-alveolar interpostas por regiões de infiltrado celular compatíveis com fibrose e hemorragia no parênquima pulmonar de animais expostos ao cigarro de palha. Em contrapartida, os resultados observados nos animais expostos ao cigarro industrial apresentam áreas de alargamento alveolar, mas sem presença de regiões compatíveis com fibrose. Porém, ambos demonstram histoarquitetura compatível com enfisema pulmonar. Esses resultados decorrem possivelmente dos diversos agentes nocivos presentes tanto na fumaça do cigarro industrial quanto no cigarro de palha, embora apresentem constituintes físicos distintos em suas composições (Roemer, 2004 e Valença et al., 2006). Evidenciados pela presença de filtros no CI, o que supostamente minimiza a absorção de tais substâncias, e a palha de milho no CP, ambos, mesmo assim, apresentam toxicidade quando inalados. De acordo com *U.S. Department of Health and Human Services* (2010), a queima do tabaco libera pequenas partículas tóxicas capazes de penetrar nos pulmões e compostos voláteis e semivoláteis, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, *N*-nitrosaminas, cádmio, níquel, arsênio, entre outros elementos químicos nocivos. Conhecidamente, estas partículas, quando inaladas cronicamente, aceleram o envelhecimento pulmonar, afetando diretamente sua capacidade ventilatória e levam a uma destruição do epitélio respiratório com consequente espessamento de septo e alargamento de área alveolar, comprometendo suas funções respiratórias (Ito, 2009; Vij., 2016).

As alterações morfológicas são encontradas nas vias aéreas proximais e distais, parênquima e vasculatura pulmonar, que, juntas, caracterizam um quadro de enfisema pulmonar (Churg et al., 2004; Barnes et al., 2015). Sabe-se que as alterações estruturais causadas pela fumaça de cigarro industrializado são sinalizadas pelo intenso influxo inflamatório e estresse oxidativo, que contribui para a quebra da matriz extracelular (Yao et al., 2008; Kirkham, 2013). No entanto, até o presente momento não existem confirmações científicas sobre os efeitos do cigarro de palha sobre o epitélio respiratório. Dados morfométricos confirmam os resultados histológicos, mostrando um aumento do diâmetro alveolar compatível com o enfisema, tanto no cigarro de palha quanto no cigarro industrial. Assim, a partir deste estudo, sugere-se a ocorrência de um quadro enfisematoso induzido pela exposição crônica ao cigarro de palha, semelhante ao cigarro industrializado. Porém, vale ressaltar que o cigarro de palha parece apresentar também um importante componente fibrótico, além do carácter enfisematoso na sua histoarquitetura pulmonar.

A exposição da fumaça de cigarro, em particular o cigarro industrializado, está associada com aumento da resposta oxidativa e declínio da defesa antioxidante (Nesi et al., 2016). Neste sentido, o uso de compostos ricos em antioxidantes considera-se uma estratégia eficaz para aprimorar o estado redox, consequentemente combatendo os efeitos da fumaça de cigarro. A erva-mate, *Ilex paraguariensis*, apresenta propriedades antioxidantes que são capazes de preservar o espaço alveolar e o parênquima pulmonar de animais expostos à fumaça de cigarro industrializado (Lanzetti et al., 2008). O remodelamento de via aérea e pulmonar envolve a deposição de proteínas de matriz extracelular e inflamação (Golestani et al., 2016), e o mate pode proteger parcialmente as fibras colágenas da ação das proteases, podendo minimizar o processo fibrótico, um dos responsáveis pela perda da função elástica do tecido pulmonar. Nossos dados morfométricos suportam ainda o papel da erva-mate em minimizar os danos estruturais

causados pela fumaça de cigarro industrial e, principalmente, de palha, favorecendo a redução do diâmetro alveolar médio. Assim, as propriedades antioxidantes presentes no extrato da erva-mate protegem o parênquima pulmonar de um processo enfisematoso com componente fibrótico. Os mecanismos desses efeitos são parcialmente discutidos nos resultados apresentados a seguir.

O estresse oxidativo tem sido identificado como um dos principais fatores envolvidos no enfisema pulmonar induzido pelo cigarro, devido à produção excessiva de ERO e ERN (Valença et al., 2009; Arunachalam et al., 2010; Gupta et al., 2016) ou depleção de antioxidantes (Koike et al., 2010) decorrentes da exposição crônica ao tabaco. Além de conter diversos oxidantes, a fumaça de cigarro, quando inalada, pode iniciar uma série de reações celulares e originar ERO adicionais (Van der Vaart et al., 2004). Além disso, a fumaça de cigarro promove o recrutamento e ativação de neutrófilos e macrófagos, que atuam como fonte endógena de oxidantes, como superóxidos e peróxidos de hidrogênio (O'Donnell et al., 2006; Wong et al., 2016). Ambos os fatos podem justificar os resultados obtidos no presente estudo em que a exposição a ambos os tipos de cigarro promoveu elevados níveis de DCF, um indicador da produção de peróxido de hidrogênio na célula (Wojtala et al., 2014). A produção aumentada de oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, desencadeia uma cascata de eventos celulares que culminam com danos oxidativos em biomoléculas, comprometendo a estrutura e função pulmonar (Bargagli et al., 2009). Neste sentido, em recente estudo, Gupta e colaboradores (2016), usando um modelo experimental de dano por cigarro e células pulmonares humanas, demonstraram que oxidantes presentes no fumo do tabaco não só causam dano oxidativo direto em proteínas pulmonares, contribuindo para a maior parte da lesão pulmonar, mas também ativam um fator celular pró-inflamatório chave (Rtp801) envolvido na lesão pulmonar induzida pelo fumo do tabaco.

Nossos dados ainda demonstraram que a suplementação de erva-mate promoveu uma redução significativa nos níveis de DCF nos animais expostos a ambos os tipos de fumaça de cigarro, contudo, surpreendentemente, animais expostos ao ar ambiente e suplementados com erva-mate apresentaram também níveis elevados de DCF, fato este que precisa ser aprofundado, pois não encontraram-se razões objetivas que justifiquem esse resultado. De todo modo, a capacidade de reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio em animais expostos à fumaça de cigarro pode estar associada a dois fatores, que dão à erva-mate uma propriedade antioxidante, a presença de polifenóis (Anesini et al., 2006; Bracesco et al., 2011; Berté et al., 2011; Colpo et al., 2016) e a capacidade de quelar o ferro (Colpo et al., 2016). Em relação aos polifenóis, Anesini e colaboradores (2006) sugerem que o ácido clorogênico, um composto fenólico, pode ser o principal responsável pela atividade antioxidante da erva-mate. Isso porque o ácido clorogênico corresponde aproximadamente a 42% dos polifenóis presentes da erva-mate (Colpo et al., 2016) e possui uma atividade tipo-peroxidase (Anesini et al., 2006; Berté et al., 2011), como as catalases, enzimas que impedem o dano oxidativo celular através da degradação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Alfonso-Prieto et al., 2009). Esta atividade tipo-peroxidase está fortemente relacionada com a concentração de polifenóis da erva-mate; ou seja, quanto maior a concentração de polifenóis maior será a capacidade de atividade antioxidante (Heck e Mejia, 2007).

Em recente estudo, Colpo e colaboradores (2016) demonstraram que o extrato de erva-mate apresentou elevada capacidade em quelar ferro (Fe^{2+}), o que poderia também justificar o potencial oxidativo pulmonar induzido pela fumaça de cigarro observado no presente estudo, dado que o Fe^{2+} tem um papel central na produção de radicais livres por se ligar ao peróxido de hidrogênio e formar radical hidroxila, via reação de Fenton (Halliwell e Gutridge, 2007). Entretanto, também observamos que a erva-mate elevou os níveis de DCF nos animais expostos ao ar ambiente. Esse efeito inesperado da erva-mate poderia também estar relacionado ao fato da sua capacidade em quelar ferro, uma vez que este metal de transição é um elemento essencial para a hemoglobina, a mioglobina, as ciclo-oxigenases e muitas outras proteínas estruturais necessárias na constituição de diferentes tecidos. Essa hipótese é apenas uma suposição, que merece estudos adicionais.

O desequilíbrio do estado redox pulmonar ocorre devido ao aumento de oxidantes em detrimento à deficiência de antioxidantes endógenos, como a glutathiona, que tem sido associada com a progressão de doenças pulmonares (Bargagli et al., 2009). Nossos resultados demonstram que a erva-mate promoveu um aumento no conteúdo de GSH nos grupos ar ambiente e cigarro de palha. A glutathiona é um tripeptídeo que pode reagir com uma vasta gama de moléculas, tornando-se um antioxidante eficaz na detoxificação dos diferentes componentes reativos eletrofílicos presentes ou induzidos pela fumaça de cigarro (Gould et al., 2011). Além da erva-mate apresentar propriedades antioxidantes naturais, como já discutido anteriormente, seus efeitos também contribuem para elevar o conteúdo de moléculas endógenas de defesa antioxidante, como a glutathiona. Um dos mecanismos propostos sugere que, mesmo em baixas concentrações, compostos fenólicos estimulam fatores de transcrição como NRF2, que regulam o gene para a síntese de GSH nas

células (Myhrstad et al., 2002). Adicionalmente, o papel da GSH em sistemas biológicos está associado com sua capacidade de conjugar-se a elementos xenobióticos, como aqueles presentes na fumaça de cigarro. Durante a fase II do metabolismo de xenobióticos, estes metabólitos ativados são conjugados com a glutatona numa reação catalisada por um grupo de transferases (Moskaug et al., 2005). Neste sentido, a síntese de glutatona estimulada por compostos fenólicos podem ser benéficas no tratamento celular de substâncias tóxicas ao organismo, como às presentes na fumaça de cigarro.

Uma das consequências que ocorrem nos tecidos em função de desequilíbrio redox são modificações oxidativas de enzimas e proteínas estruturais, as quais desempenham um papel importante na etiologia e/ou progressão de várias doenças. De acordo com Panda e colaboradores (2001), a integridade estrutural do pulmão e consequente enfisema, como observado no presente estudo, decorrem principalmente de um aumento na proteólise celular em função da modificação oxidativa, pelo cigarro, de proteínas constitutivas do pulmão. Essas modificações ou oxidações podem ser induzidas diretamente por ERO e/ou ERN ou indiretamente pelas reações de subprodutos secundários produzidos pela lipoperoxidação, formando produtos lipoproteicos (Curtis et al., 2012). Os resultados do presente estudo demonstram índices elevados de modificação proteica pelos diferentes tipos de cigarro, os quais foram significativamente reduzidos pela suplementação de erva-mate. Estudos prévios do nosso laboratório têm demonstrado um aumento nos parâmetros de modificação proteica em pulmão de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro (Menegali et al., 2009; Nesi et al., 2016), decorrente do estímulo que o cigarro promove sobre a produção de ERO e ERN no pulmão, como já discutido anteriormente. Entretanto, devido à fumaça de cigarro, ao ser inalada, interagir diretamente com os epitélios do pulmão, a elevada presença de oxidantes na fumaça pode ser também responsável pelas lesões observadas em nosso estudo. Em recente estudo, Gupta e colaboradores (2016) demonstraram que a fumaça de cigarro é capaz de oxidar diretamente proteínas pulmonares na ausência dos mecanismos de indução endógena de ERO e ERN. Esses resultados indicam que as modificações proteicas que levam aos danos estruturais no pulmão podem ser decorrentes do potencial oxidativo do próprio cigarro, embora tenhamos observado níveis elevados de oxidantes celulares.

A redução desses indicadores de modificação proteica pela erva-mate decorre possivelmente por ela exercer papel antioxidante direta ou indiretamente, como citado anteriormente, independentemente se a origem do dano é por ERO ou ERN. A erva-mate promoveu redução dos níveis de carbonilação e formação de 3-nitrotirosina, independentemente do tipo de cigarro, possivelmente devido ao fato de que a erva-mate faz com que a fumaça perca a sua capacidade de provocar a oxidação da proteína, o que pode sugerir que a sua oxidante é o principal responsável pela redução da lesão pulmonar.

Adicionalmente à modificação proteica, o aumento de metaloproteinases, proenzimas que promovem a degradação da matriz extracelular (Greenlee et al., 2007), induzidas por ERO ou ERN (Bargagli et al., 2009) tornam o tecido pulmonar mais suscetível, dado o potencial oxidante dos componentes presentes na fumaça de cigarro. De acordo com Greenlee et al. (2007), a fumaça do cigarro estimula o recrutamento de células inflamatórias no parênquima pulmonar, levando à liberação de proteases que destroem a matriz extracelular do pulmão. Dessa forma, as metaloproteinases recrutam células inflamatórias induzidas pela fumaça de cigarro para o pulmão e resulta no alargamento do espaço aéreo e enfisema, como observado no presente estudo.

Nossos resultados mostram que o conteúdo de MMP-3 aumentou de forma independente ao tipo de cigarro, da mesma forma que a erva-mate protegeu esse aumento. Entretanto, os níveis de VEGF aumentaram somente nos animais expostos a fumaça de cigarro de palha, sendo revertido pela erva-mate.

A fumaça do cigarro estimula o recrutamento de células inflamatórias no parênquima pulmonar, levando à liberação de endoproteases elastolíticas, conhecidas como metaloproteinases de matriz, que destroem o pulmão e a matriz extracelular e resulta na ampliação do espaço aéreo e enfisema (Told et al., 2006).

A MMP-3 é uma endoprotease que degrada diferentes tipos de colágeno, proteoglicanos, fibronectina, laminina, elastina. Além disso, a MMP-3 pode também ativar outras MMPs tais como MMP-1, MMP-7 e MMP-9 (Yamashita et al., 2014). O papel da MMP-3 nas alterações pulmonares induzidas pelo cigarro ainda é pouco investigado, porém estudos prévios demonstram uma relação direta entre o cigarro e o aumento na expressão e atividade da MMP3. Bulmansi et al. (2012), demonstraram por exemplo, que a exposição ao extrato da fumaça de cigarro em células cultivadas de ligamento periodontal aumentou a expressão de MMP1 e MMP3. Told et al. (2006) sugerem que expressão de MMP-3 é regulada pela produção de ERO e ERN e contribui para a doença vascular relacionada ao tabagismo.

O VEGF é um fator de crescimento envolvido na sinalização celular para vasculogêneses e angiogêneses e apresenta propriedades pró-inflamatórias (Hamada et al., 2005). No pulmão, o VEGF funciona como um fator miogênico, de sobrevivência e de diferenciação de células endoteliais (Ferrara,

2004). A deficiência de VEGF possui importante papel na patogênese do enfisema em animais (Suzuki et al., 2008), entretanto, níveis elevados podem comprometer a estrutura e função pulmonar (Hamada et al., 2005). Os resultados do presente estudo mostram um aumento nos níveis de VEGF somente nos animais expostos a fumaça de cigarro de palha, sendo revertido pela erva-mate. Suzuki e colaboradores (2008) relataram que fumantes de cigarro industrializado apresentam níveis reduzidos de VEGF e isso está diretamente relacionado ao quadro de enfisema em humanos (Kasahara et al., 2001). Ao contrário, o aumento de VEGF no cigarro de palha pode estar diretamente associado com o quadro de fibrose, aparentemente mais característico no pulmão de animais expostos a este tipo de cigarro, como observado anteriormente. Essa possibilidade decorre de informações prévias, de que o aumento na expressão de VEGF no fluido de lavado broncoalveolar de animais expostos a bleomicina em modelo experimental de fibrose, observado por Hamada et al. (2005), promove uma permeabilidade aumentada nas fases iniciais da lesão celular e um aumento de angiogênese e recrutamento de mediadores inflamatórios e fibrolíticos, que em conjunto promovem o processo fibrótico no tecido. Em todas as formas de fibrose pulmonar, os fibroblastos são as células mais predominantes (Ramos et al., 2001) e são ativadas por VEGF secretados pelas células do epitélio respiratório em resposta ao quadro inflamatório, promovendo a proliferação dessas células, resultando em áreas fibróticas (Chaudhary et al., 2007). Embora não tenhamos avaliado a presença predominantemente de fibroblastos, é razoável sugerir que este seja o principal mecanismo relacionado ao aumento de VEGF observado no presente estudo.

Os efeitos positivos da erva-mate sobre o conteúdo de MMP-3 e VEGF, além de sua capacidade antioxidante, podem estar associados a sua capacidade de reduzir células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (Puangpraphant e de Mejia, 2009; Schinella et al., 2014), os quais secretam diversas MMPs e fatores de crescimento em diferentes tecidos após a exposição à fumaça de cigarro (Told et al., 2006; Bulmanski et al., 2012).

Tomados em conjuntos, esses resultados demonstram que os efeitos no estado redox pulmonar que decorrem da exposição crônica ao tabaco parecem ser independentes do tipo de cigarro, entretanto, as alterações estruturais e funcionais induzidas por ambos os tipos de cigarro promovem um quadro enfisematoso. Porém, a exposição ao cigarro de palha torna a histoarquitetura comprometida, dada sua capacidade em promover mudanças estruturais características de um quadro fibrótico mediado possivelmente pelo aumento no conteúdo de VEGF e consequente degradação da matriz extracelular. Entretanto, o consumo concomitante da erva-mate ao ativar mecanismos de proteção celular ou por liberar propriedades intrínsecas já comprovadas, regulam o estado redox e reduzem o risco nocivo do cigarro de palha sobre o pulmão.

CAPÍTULO V
CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES

A inquietação motivadora desse estudo decorreu da observação inicial do elevado consumo do cigarro de palha pela população brasileira, o qual tende a ser agravado pela recente exploração comercial por empresas que promovem a venda do mesmo em caixas coloridas e atrativas e que levam aos consumidores a falsa ideia de que, por ser produto natural e artesanal, são inofensivos à saúde. Devido à inexistência de estudos científicos referentes à constituição química deste cigarro, tampouco estudos que mostrem seus efeitos bioquímicos e moleculares no sistema respiratório, essa investigação assume um caráter inovador e de relevância social por demonstrar, pela primeira vez, os efeitos nocivos à saúde do cigarro de palha. Somado a isso, o consumo de erva-mate tem se popularizado nos últimos anos, principalmente nas regiões do sul do país, devido ao contexto cultural e também pelos relatos científicos e disseminados nos meios de comunicação de massa que atribuem à erva-mate um caráter nutragênico. Neste sentido, adotar estratégias alimentares que comprovadamente reduzem os efeitos nocivos do tabaco poderá contribuir com a saúde da população. Diante do exposto, concluímos que:

1. **O cigarro de palha é tão nocivo quanto o cigarro industrializado**, uma vez que os metais tóxicos e compostos orgânicos libertados do fumo durante a combustão são amplamente absorvidos no sistema respiratório.
2. Embora a natureza da lesão provocada por ambos os tipos de cigarros pareça ser similar, **as mudanças na histoarquitetura dos tecidos analisados neste estudo, particularmente no pulmão e traqueia, são dependentes dos tipos de cigarros** e merecem atenção em estudos futuros.
3. As alterações estruturais e funcionais induzidas por ambos os tipos de cigarro podem promover um quadro enfisematoso, mas **a exposição ao cigarro de palha torna a histoarquitetura pulmonar mais comprometida, dada a capacidade do cigarro de palha em promover mudanças estruturais características de um quadro fibrótico, possivelmente mediado pelo aumento no conteúdo de VEGF e consequente degradação da matriz extracelular.**
4. **A erva-mate promove proteção celular e reduz os riscos nocivos do cigarro de palha**, provavelmente por regular o estado redox e manter a integridade da matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

- Abrantes R, Assunção JV, Pesquero CR, Bruns RE; Nobrega RP. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from gasoline and ethanol vehicles. *Atmospheric Environment*. 2009;(43):648-654.
- Agbandji L, Patrick EA, Gbago, GB, Koumolou L, Adisso S, Guedenon P, Ahodjide, S, Sinsin B, Boko M. Comparison of heavy metals contents for some cigarettes brands. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2012; 7 (4), 149-153.
- Agius AM, Wake M, Pahor AL, Smallman LA. Smoking and middle ear ciliary beat frequency in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 1995;115:44-9.
- Al-Awaida W, Akash M, Aburubaiha Z, Talib WH, Shehadeh H. Chinese green tea consumption reduces oxidative stress, inflammation and tissues damage in smoke exposed rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17(10):740-6.
- Anesini C, Ferraro G, Filip R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. *Food Chemistry*. 2006;97(3): 459-64. 8.
- Araújo AJ, Menezes AMB, Dórea AJPS, Torres BS, Viegas CAA, Silva CAR, Kirchenchtein C, Orfaliais CS, Sant'anna CC, Botelho C, Gonsalves CMC, Haggstram FM, Godoy I, Reichert J, Chatkin JM, Ayoub LTV, Pereira LFF, Halty LS, Sales MPU, Oliveira MVC, Castillo PL, Meireles RHS, Diretrizes para Cessação do Tabagismo. *Jornal Brasileiro Pneumologia*. 2004: vol.30, suppl.2, pp.S1-S76.
- Almeida TS, de Andrade RM, de Gois JS. & Borges DLG. Development of a simple and fast ultrasound-assisted extraction method for trace element determination in tobacco samples using ICP-MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2014; Vol 94 (8):756-764.
- Arunachalam G, Sundar IK, Hwang JW, Yao H, Rahman I. Emphysema is associated with increased inflammation in lungs of atherosclerosis-prone mice by cigarette smoke: implications in comorbidities of COPD. *J Inflamm (Lond)*. 2010;22;7:34.
- Ashraf MW. Levels of heavy metals in popular cigarette brands and exposure to these metals via smoking. *Scientific World Journal*. 2012;2012:729430.
- Auerback O, Stout AP, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. *N Engl J Med*. 1961;265(6):253-67.
- Alves GR, Marchiori E, Irion KL, Teixeira PJ, Berton DC, Rubin AS, Hochhegger B. The effects of dynamic hyperinflation on CT emphysema measurements in patients with COPD. *Eur J Radiol*. 2014; Dec;83(12):2255-9.
- Aydin S, Ogeturk M, Kuloglu T, Kavakli A, Aydin S. Effect of carnosine supplementation on apoptosis and irisin, total oxidant and antioxidants levels in the serum, liver and lung tissues in rats exposed to formaldehyde inhalation. *Peptides*. 2015; Feb;64:14-23.
- Bandiera FC, Loukas A, Wilkinson AV, Perry CL. Associations between tobacco and nicotine product use and depressive symptoms among college students in Texas. *Addict Behav*. 2016; Jun 29;63:19-22.
- Barnes PJ, Hansel TT. Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004 Sep 11-17;364(9438):985-96.
- Barnes, N, Calverley, P. M, Kaplan, A and Rabe, K. F. Chronic obstructive pulmonary disease and exacerbations: clinician insights from the global Hidden Depths of COPD survey. *Curr Med Res Opin*. 2014; 30; 4:667-12.
- Barnes PJ, Burney PG, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, Wouters EF. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;Dec 3;1:15076.

- Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Muller-Quernheim J, Rottoli P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respir Med.* 2009;103(9):1245-56.
- Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya AC, Cunha IB, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules.* 2007 Mar 12;12(3):423-32.
- Behera SN, Xian H, Balasubramanian R. Human health risk associated with exposure to toxic elements in mainstream and sidestream cigarette smoke. *Sci Total Environ.* 2014 Feb 15;472:947-56.
- Bonelli PR, Della Rocca PA, Cerrella EG, Cukierman AL. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil Nut shells, *Bioresour Technol.* 2001;76(1):15-22.
- Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Muller-Quernheim J, Rottoli P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review *Respir Med.* 2009; 103(9):1245-56.
- Bascom R, Kesavanathan J, Fitzgerald TK, Cheng KH, Swift DL. Sidestream tobacco smoke exposure acutely alters human nasal mucociliary clearance. *Environ Health Perspect.* 1995;103:1026-30.
- Baker F, Ainsworth SR, Dye JT, Crammer C, Thun MJ, Hoffmann D, Repace JL, Henningfield JE, Slade J, Pinney J, Shanks T, Burns DM, Connolly GN, Shopland DR. Health risks associated with cigar smoking. *JAMA.* 2000; Aug 9;284(6):735-40.
- Burris KP, Davidson PM, Stewart CN Jr, Zivanovic S, Harte FM. Aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a natural antimicrobial against *Escherichia coli* O157:H7 in a microbiological medium and pH 6.0 apple juice. *J Food Prot.* 2012 Apr;75(4):753-7.
- Berté KAS, Beux MR, Spada PK, Salvador M. & Hoffmann-Ribani R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A St. Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59: 5523–5527.
- Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of Ethnopharmacology.* *J Ethnopharmacol.* 2011; Jul 14;136(3):378-84.
- Briggs RD, Wright ST, Cordes S, Calhoun KH. Smoking in chronic rhinosinusitis: a predictor of poor long-term outcome after endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope.* 2004;114(1):126-8.
- Bulmanski Z, Brady M, Stoute D, Lallier TE. Cigarette smoke extract induces select matrix metalloproteinases and integrin expression in periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 2012; Jun;83(6):787-96.
- Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect.* 2006;114(4):542-546.
- Calderón-Garcidueñas L, Valencia-Salazar G, Rodríguez-Alcaraz A, Gambling TM, García R, Osnaya N, Villarreal-Calderón A, Devlin RB, Carson JL. Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:132-8.
- How Tobacco Smoke Causes Disease Center for Disease Control and Prevention. 2010. Centers for Disease Control and Prevention; National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion; Office on Smoking and Health (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking - Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. In: Chemistry. Chemistry and Toxicology of Cigarette Smoke and Biomarkers of Exposure and Harm. Atlanta (GA). 2010; 29-80.

Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med.* 2006; Jul;100(7):1270-6.

Colpo AC, Rosa H, Lima ME, Pazzini CE, de Camargo VB, Bassante FE, Puntel R, Ávila DS, Mendez A, Folmer V. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem.* 2016;.15;209:185-95.

Cohen NA, Zhang S, Sharp DB, Tamashiro E, Chen B, Sorscher EJ, Woodworth BA. Cigarette smoke condensate inhibits transepithelial chloride transport and ciliary beat frequency. *Laryngoscope* 2009.

Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; Aug;283(2):L246-55.

Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burrill JS, Arriaga EA, Bernlohr DA. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(8):399-406.

Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F, Müller-Quernheim J, Prasse A, Zissel G, Schnapp A, Park JE. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J.* 2007; May;29(5):976-85.

Chetan S. Nasal mucociliary clearance in snuff users. *J Laryngol Otol.* 1993;107:24-6.

Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(5):492-8.

Czekaj P, Pałasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, Kamiński M. Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health.* 2002;75 Suppl:S27-35.

Das KK, Das SN, Dhundasi SA. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian J Med Res.* 2008; 128(4):412-25.

Das B, Maity PC, Sil AK. Vitamin C forestalls cigarette smoke induced NF- κ B activation in alveolar epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2013; Jun 20;220(1):76-81.

De Luca L e Rigatto M. Epidemiologia do tabagismo: fumo e carboxihemoglobina. *Jornal de Pneumologia.* 1982;8(3):146-50.

David LN, Michael MC. *Lehninger Principles of Biochemistry* 4 Ed. 2012.

Duarte JL, de Faria FAC, Ceolin S, Cestari TM, de Assis GF. Efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro sobre as pregas vocais de rato *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(2):210-6.

Demirbas A. Effects of temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 2004; (72) 243–248.

De Souza AAR. Análise mucociliar e das propriedades reológicas do muco em portadores de câncer pulmonar e extra-pulmonar. Tese (Doutorado), 2009. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Domej W, Oetl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014;17:9:1207-24.

Dórea AJP, Botelho C. Diretrizes para Cessação do tabagismo. Fatores dificultadores da cessação do tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30 (Supl 2) Agosto de 2004.

Dos Santos, KA Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) em embalagens plásticas / Kleber Alves dos Santos. - Curitiba, 2004.xvi, 109 f.: il. Dissertação (Mestrado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Djordjevic MV, Stellman SD, Zang E. Doses of nicotine and lung carcinogens delivered to cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(2):106-11.18.

Dye JA, Adler KB. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax.* 1994 Aug;49(8):825-34.

Elsayed NM e Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutrition Research.* 2001; 21 (3):551-16.

Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D, La Vecchia C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res.* 1990;15;50(20):6502-7.

Flores G, Dastmalchi K, Wu SB, Whalen K, Dabo AJ, Reynertson KA, Foronjy RF, D Armiento JM, Kennelly EJ. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chem.* 2013; Nov 15;141(2):889-95.

Gaworski CL, Dozier MM, Eldridge SR, Morrissey R, Rajendran N, Gerhart JM. Cigarette smoke vapor-phase effects in the rat upper respiratory tract. *Inhalation Toxicol.* 1998;10:857-73.

Gao H, Long Y, Jiang X, Liu Z, Wang D, Zhao Y, Li D, Sun BL. Beneficial effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. *Exp Gerontol.* 2013; Jun;48(6):572-8. 2.

Gea J, Pascual S, Casadevall C, Orozco-Levi M, Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings. *J Thorac Dis.* 2015; 7(10):418-38.

Gerritsen WB, Asin J, Zanen P, van den Bosch JM, Haas FJ. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med.* 2005 Jan;99(1):84-90.

Gochman, E, Reznick, A. Z, Avizohar, O, Ben-Amotz, A, Levy, Y. Exhaustive exercise modifies oxidative stress in smoking subjects. *Am J Med Sci.* 2007; (333)6: 346-8.

Gould NS, Min E, Gauthier S, Martin RJ, Day BJ. Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure. *Respir Res.* 2011; Oct 7;12:133.

Golestani R, Razavian M, Ye Y, Zhang J, Jung JJ, Toczek J, Gona K, Kim HY, Elias JA, Lee CG, Homer RJ, Sadeghi MM. Matrix metalloproteinase-targeted imaging of lung inflammation and remodeling. *J Nucl Med.* 2016 ;Jul 28.

Gupta I, Ganguly S, Rozanas CR, Stuehr DJ, Panda K. Ascorbate attenuates pulmonary emphysema by inhibiting tobacco smoke and Rtp801-triggered lung protein modification and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 19:113(29):E4208-17.

Gugliucci A, Bastos DH, Schulze J, Souza MF. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia.* 2009 Sep;80(6):339-44.

Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev.* 2007;87(1):69-98.

GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention, Updated 2015.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Updated, 2016.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical in Biology Medicine University Press, Oxford, NY. 1999.

Hamada N , Kuwano K, Yamada M, Hagimoto N, Hiasa K, Egashira K, Nakashima N, Maeyama T, Yoshimi M, Nakanishi Y. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J Immunol.* 2005;15:175(2):1224-31.

Heck CI e de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007;Nov;72(9):R138-51.

Hoyt JC, Robbins RA, Habib M, Springall DR, Buttery LD, Polak JM, Barnes PJ. Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. *Exp Lung Res.* 2003 Jan-Feb;29(1):17-28.

Huang YC, Kuo YH, Huang YH, Chen CS, Ho DR, Shi CS. The Effects of Adipose-Derived Stem Cells in a Rat Model of Tobacco-Associated Erectile Dysfunction. *PLoS One.* 2016; 3;11(6).

Hwang JW, Yao H, Caito S, Sundar IK, Rahman I. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol Med.* 2013; 61C: 95–110.

Instituto Nacional de Câncer (BR); Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco. Prevalência do tabagismo. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/site/home/dados_numeros/prev_alencia-de-tabagismo>. Acesso em: 28 jul. 2016.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Organização Pan Americana da Saúde Pesquisa especial de tabagismo – PETab: relatório Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Organização Pan-Americana da Saúde. – Rio de Janeiro: INCA, 2011.

Iribarren C, Tekawa IS, Sidney S, Friedman GD. Effect of cigar smoking on the risk of cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer in men. *N Engl J Med.* 1999;340(23):1773-80.

Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest.* 2009;135(1):173-80.
Instituto Nacional de Câncer (BR)

Instituto Nacional de Câncer (BR) INCA (2015) Percentual de fumantes homens que usam narguilénoBrasilmaisquedobraemcincoanos.http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/percentual_fumantes_homens_que_usam_narguile_mais_que_dobra_em_cinco_anos_brasil. Acesso 03 set. 2015.

Iwegbue CM, Nwajei GE, Eguavoen O. Metal distribution in some brands of cigarette ash in Nigeria. *J Environ Sci Eng.* 2009; 51(2):93-6.

Jardim JR, Bizeto L, Fleig Mayer A, Camelier A, Warken Rosa F, Oliveira D, Azevedo D, Hilário Saldiva P, Arruda Martins M, Bonassa J, Nascimento OA. An Inhalation Chamber Model for Controlled Studies of Tobacco Smoke Toxicity in Rodents *Arch Bronconeumol.* 2010;46(9): 455-458.

Jacobsen O, Malaguti C, Júnior JAS, Jorge Willian Leandro Nascimento JWL. Envolvimento do tabagismo e apoptose na patogênese da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Rev Med Minas Gerais.* 2011;21(1): 61-68.

Javadian S, Stigler-Granados P, Curtis C, Thompson F, Huber L, Novotny TE. Perspectives on Tobacco Product Waste: A Survey of Framework Convention Alliance Members' Knowledge, Attitudes, and Beliefs. *Int J Environ Res Public Health.* 2015 Aug 18;12(8):9683-91.

Johnson.S. Gradual micronutrient accumulation and depletion in Alzheimer's disease Medical Hypotheses. 2001; Vol 56(6)595-597.

Karaman M, Tek A. Deleterious effect of smoking and nasal septal deviation on mucociliary clearance and improvement after septoplasty. Am J Rhinol Allergy. 2009;23(1):2-7.

Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar;163(3 Pt 1):737-44.

Kazi TG, Jalbani N, Arain MB, Jamali MK, Afridi HI, Shah AQ. Determination of toxic elements in different brands of cigarette by atomic absorption spectrometry using ultrasonic assisted acid digestion. Environ Monit Assess. 2009;154(1-4):155-67.

Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. Chest. 2013;144(1):266-73.

Koike K, Kondo Y, Sekiya M, Sato Y, Tobino K, Iwakami SI, Goto S, Takahashi K, Maruyama N, Seyama K, Ishigami A. Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010; Jun;298(6):L784-92.

Lanzetti M, Bezerra FS, Romana-Souza B, Brando-Lima AC, Koatz VL, Porto LC, Valença SS. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. Nutrition. 2008; Apr;24(4):375-81.

Lanzetti M, Lopes AA, Ferreira TS, de Moura RS, Resende AC, Porto LC, Valença SS. Mate tea ameliorates emphysema in cigarette smoke-exposed mice. Exp Lung Res. 2011;37(4):246-57.

Lanzetti M, Barroso MV, Nesi RT, Lopes AA, Trajano ETL, Alves JN, Brogliato AR, Borges PA, Benjamim CF, Porto LC, Valença SS. Ready-to-drink matte® tea shows anti-inflammatory and antioxidant properties on a cigarette smoke exposure model. Food Research International. 2012;48, 798-801.

Lopes AA, Ferreira TS, Nesi RT, Lanzetti M, Pires KM, Silva AM, Borges RM, Silva AJ, Valença SS, Porto LC. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. Bioorg Med Chem. 2013; 15;21(24):7570-7.

Medeiros AC, Rocha KFB, Filho AMD, Neto TA, Azevedo IM. Lesões Pulmonares provocadas pela nicotina por via subcutânea em ratas . Acta. Cirúrgica Brasileira. 2003; Vol 18 Supl. 1.

Meirelles, RHS. Tabagismo e DPOC – dependência e doença – fato consumado. Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. Pulmão RJ - Atualizações Temáticas. 2009; v. 1;13-19.

Mendis S, Puska P, Norrving B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization, Geneva 2011.

Menezes AMB. Epidemiologia da bronquite crônica e do enfisema (DPOC): até onde sabemos? J Bras Pneumol.1997;23(3):153-157.

Mello PRB, Okay TS, Doris EFGC, Botelho C. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. PULMÃO RJ. 2005; 14 (3).

Menegali BT, Nesi RT, Souza PS, Silva LA, Silveira PC, Valença SS, Pinho RA. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. Pulm Pharmacol Ther. 2009;22(6):567-73.

Milara J, Cortijo J. Tobacco, inflammation, and respiratory tract cancer. *Curr Pharm Des.* 2012;18(26):3901-38.

Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão (BR); Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE; Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. Tabagismo. Rio de Janeiro, 2009.

Ministério da Saúde. Promoção da Saúde Tabagismo: Principal causa de morte evitável em todo o mundo. Acesso em: 28 maio. 2015.

Disponível:<<http://promocaodasaude.saude.gov.br/promocaodasaude/assuntos/controle-ao-tabagismo/noticias/tabagismo-principal-cao-de-morte-evitavel-em-todo-o-mundo>>.

Moreno-Gonzalez I, Estrada LD, Sanchez-Mejias E, Soto C. Smoking exacerbates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2013;4:1495.

Mladjenovic N, Maertens RM, White PA, Soo EC. Mutagenicity of smoke condensates from Canadian cigarettes with different design features. *Mutagenesis.* 2014; 29(1):7-15.

Morais E.C. Avaliação dos efeitos hipocolesterolêmico, antioxidante e anti- inflamatório da infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em indivíduos normolipidêmicos ou dislipidêmicos, usuários ou não de estatina [dissertação] Florianópolis, 2009.

Morse D e Rosas IO. Tobacco smoke-induced lung fibrosis and emphysema. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:493-513.

Moskaug JØ, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr.*2005; Jan;81(1 Suppl):277S-283S.

Mullen JBM, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Structure of central airways in current smokers and ex-smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lung function. *Thorax.* 1987;42:843-8.

Muscat JE e Wynder EL. Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer. *Cancer.* 1992;69:2244-51.

Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivationof the glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:386 –93.

Nadruz W Jr, Gonçalves A, Claggett B, Querejeta Roca G, Shah AM, Cheng S, Heiss G, Ballantyne CM, Solomon SD.Influence of cigarette smoking on cardiac biomarkers: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Eur J Heart Fail.* 2016; Jun;18(6):629-37.

Nesi RT, de Souza PS, Dos Santos GP, Thirupathi A, Menegali BT, Silveira PC, da Silva LA, Valença SS, Pinho RA.Physical exercise is effective in preventing cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response in mice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;22;11:603-10.

Niel M. Drogas e Redução de Danos: uma cartilha para profissionais de saúde/Redução de Danos para Drogas Fumadas. São Paulo, 2008.xi, 149f. Programa de Orientação e Atendimento a Dependentes (PROAD). Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Ministério da Saúde, 2008.

Ogino S, Nose M, Irifune M, Kikumori H, Igarashi T. Nasal muco-ciliary in patients with upper and lower respiratory diseases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1993;55:352-5.

Öberg M, Woodward A, Jaakkola MS, Peruga A, Prüss-Ustün A. Global estimate of the burden of disease from second-hand smoke / by Mattias Öberg. 2010.

O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*. 2006;61(5):448–454.

Panda K, Chattopadhyay R, Chattopadhyay D, Chatterjee IB. Cigarette smoke-induced protein oxidation and proteolysis is exclusively caused by its tar phase: Prevention by vitamin C. *Toxicol Lett*. 2001;123(1):21–32.

Park EM, Park YM, Gwak YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25(1):79-86.

Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio. Tabagismo PETab. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE Diretoria de Pesquisas Coordenação de Trabalho e Rendimento. 2008.

Told S, Perlstein TS, Lee RT. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; Feb;26(2):250-6.

Puangphrath S e de Mejia EG. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFκB pathways. *J Agric Food Chem*. 2009; Oct 14;57(19):8873-83.

Plum LM, Rink L, Haase H. The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; Apr;7(4):1342-65.

Ramos C, Montañó M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24: 591–598.

Reichert J, Araújo AJ, Gonçalves CM, Godoy I, Chatkin JM, Sales MP, Santos SR. Diretrizes para cessação do tabagismo. *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):845-880.

Rennard SI, Togo S, Holz O. Cigarette Smoke Inhibits Alveolar Repair. A Mechanism for the Development of Emphysema. *Proc. Am. Thorac. Soc*. 2006; v.3:p.703–708.

Reddy S, Finkelstein EI, Wong PS-Y, Phung A, Cross CE, van der Vliet A. Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Rad Biol Med*. 2002; 33: 1490-1498.

Rickert WS, Trivedi AH, Momin RA, Wagstaff WG, Lauterbach JH. Mutagenic, cytotoxic, and genotoxic properties of tobacco smoke produced by cigarillos available on the Canadian market. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011; Nov;61(2):199-209.

Ril FT, Loch CR, Valduga, AT, Macedo SMD, Cichoski, AJ. Perfil bioquímico de ratos alimentados com iogurte contendo extrato de erva-mate (*Illex paraguariensis* St. Hil). *Braz. J. Food. Technol*. Campinas 2011; v. 14, n. 4, p. 332-337.

Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009; Aug;11(8):973-9.

Roemer E, Stabbert R, Rustemeier K, Veltel DJ, Meisgen TJ, Reininghaus W, Carchman RA, Gaworski CL, Podraza KF. Chemical composition, cytotoxicity and mutagenicity of smoke from US commercial and reference cigarettes smoked under two sets of machine smoking conditions. *Toxicology*. 2004; Jan 15;195(1):31-52.

Rufino R, Costa CH. Patogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2013;12(2):19-30.

Sadowska AM, van Overveld FJ, Górecka D, Zdrzal A, Filewska M, Demkow UA, Luyten C, Saenen E, Zielinski J, De Backer WA. The interrelationship between markers of inflammation and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: modulation by inhaled steroids and antioxidant. *Respiratory Medicine*. 2005 v. 99, p. 241-249.

Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gossmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004;1102.

Serpejante C. Entenda como cada forma de consumo do tabaco é prejudicial à saúde. Charutos, cachimbos e narguilés apresentam tantos riscos quanto o cigarro. *Minha Vida – Saúde, Alimentação e Bem-estar*. Disponível em:

<<http://www.minhavidade.com.br/saude/galerias/15221-entenda-como-cada-forma-de-consumo-do-tabaco-e-prejudicial-a-saude>>. Acesso em: 28 ago. 2013.

Sobaszek A, Boulenguez C, Frimat P, Robin H, Haguenoer JM, Edme JL. Acute respiratory effects of exposure to stainless steel and mild steel welding fumes. *J Occup Environ Med*. 2000; 42(9):923-31.

Soma T, Kaganoi J, Kawabe A, Kondo K, Imamura M, Shimada Y. Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells. *Int J Cancer*. 2006; 119(5):1023–1027.

Shi Y, Cao J, Gao J, Zheng L, Goodwin A, An CH, Patel A, Lee JS, Duncan SR, Kaminski N, Pandit KV, Rosas IO, Choi AM, Morse D. Retinoic acid-related orphan receptor- α is induced in the setting of DNA damage and promotes pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; Sep 1;186(5):412-9.

Shihadeh A. e Saleh R. Polycyclic aromatic hydrocarbons, carbon monoxide, “tar”, and nicotine in the mainstream smoke aerosol of the narghile water pipe. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(5):655-61.

Shihadeh A, Azar S, Antonios C, Haddad A. Towards a topographical model of narghile water-pipe café smoking: a pilot study in a high socioeconomic status neighborhood of Beirut, Lebanon. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;79(1):75-82.

Schinella G, Neyret E, Cónsole G, Tournier H, Prieto JM, Ríos JL, Giner RM. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. *Planta Med*. 2014; Aug;80(12):961-8.

Small B. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Sinusitis: more than just an infection. *Asthma Allergy Advoc*. 2003;5:28.

Smith TL, Mendolia-Loffredo S, Loehrl TA, Sparapani R, Laud PW, Nattinger AB. Predictive factors and outcomes in endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2005;115:1199-2205.

Smith LL. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? *J Strength Cond Res*. 2004; 18:185-193.

Smith CJ, Perfetti TA, King JA. Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhal Toxicol*. 2006; Aug;18(9):667-77.

Stanley PJ, Wilson R, Greenstone MA, MacWilliam L, Cole PJ. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. *Thorax*. 1986;41:519-23.

Stewart LT. e Voelkel NF. Molecular pathogenesis of emphysema *J Clin Invest*. 2008; 1: 118(2): 394–402.

Stinn W, Arts JH, Buettner A, Duistermaat E, Janssens K, Kuper CF, Haussmann HJ. Murine lung tumor response after exposure to cigarette mainstream smoke or its particulate and gas/vapor phase fractions. *Toxicology*. 2010; Sep 10;275(1-3):10-20.

Sticozzi C, Cervellati F, Muresan XM, Cervellati C, Valacchi G. Resveratrol prevents cigarette smoke-induced keratinocytes damage. *Food Funct.* 2014; Sep;5(9):2348-56.

Suzuki M, Betsuyaku T, Nagai K, Fuke S, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nishimura M. Decreased airway expression of vascular endothelial growth factor in cigarette smoke-induced emphysema in mice and COPD patients. *Inhal Toxicol.* 2008;20(3):349-59.

Syed DN, Afaq F, Kweon MH, Hadi N, Bhatia N, Spiegelman VS, Mukhtar H. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF-kappaB activation in normal human bronchial epithelial cells. *Oncogene.* 2007; Feb 1;26(5):673-82.

Taguchi L, Pinheiro NM, Olivo CR, Toledo AC, Grecco SS, Lopes FD, Lopes FDTQS, Caperuto LC, Martins MA, Tiberio FLC, Câmara NO, Lago JHG, Prado CMA. Flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF-κB, oxidative stress and metalloproteinases. *Respiratory Research.* 2015;16:79.

Tamashiro E, Cohen NA, Palmer JN, Lima WT. Effects of cigarette smoking on the respiratory epithelium and its role in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009; Nov-Dec;75(6):903-7.

Tan X, Jin P, Feng L, Song J, Sun E, Liu W, Shu L, Jia X. Protective effect of luteolin on cigarette smoke extract-induced cellular toxicity and apoptosis in normal human bronchial epithelial cells via the Nrf2 pathway. *Oncol Rep.* 2014; Apr;31(4):1855-62.

Teixeira AMNC. Efeito da ingestão de chocolate e erva-mate na elasticidade arterial de indivíduos com HIV/Aids em terapia antirretroviral. [dissertação] São Paulo 2013.

Torres LHL. Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2009.

Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Ishikawa M, Kawagoe T, Mizuta K, Nishimura M, Homma-Takeda S, Temma K. Smoking induces bimodal DNA damage in mouse lung. *Toxicol Sci.* 2011;120:322–330.

Usas A, Maciulaitis J, Maciulaitis R, Jakubonienė N, Miasius A, Huard J. Skeletal Muscle-Derived Stem Cells: Implications for Cell-Mediated Therapies. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47(9):469-79.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; Aug 27;10(9):3886-907.

Valduga AT e Finzer JRD. Processamento de Erva-Mate. Extração de Solúveis. EdiFAPES, Erechim, RS. 2003; (5):83-109.

Valença SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol.* 2004;32(3):351-6.

Valença SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, Koatz VL, Porto LC. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFκappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(5):373-81.

Valença SS, Bezerra FS, Souza BR, Paiva RO, Costa AMA, Porto LC. Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2008;19(9), 604–611.

Valença SS e Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *J. Bras Pneumol.* 2008;34(10):787-795.

- Valença SS, Pimenta WA, Rueff-Barroso CR, Ferreira TS, Resende AC, Moura RS, Porto LC. Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Nitric Oxide*. 2009; May;20(3):175-81.
- Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*. 2004; 59(8):713-21.
- Varisco MC. Avaliação da exposição ocupacional ao monóxido de carbono em trabalhadores de postos de combustíveis. Trabalho de conclusão de curso. Novo Hamburgo, 2004.
- Viana GF, Garcia KS, Menezes-Filho JA. Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes. *Environ Monit Assess*. 2011; 181(1-4):255-65.
- Viegas CAA, Diretrizes para cessação do tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30(Supl 2) 2004.
- Viegas CAA. Formas não habituais de uso do tabaco. *J Bras Pneumol*. 2008;34(12):1069-1073.
- Vij N, Chandramani P, Westphal CV, Hole R, Bodas M. Cigarette smoke induced autophagy-impairment accelerates lung aging, COPD-emphysema exacerbations and pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016 (*in press*).
- Zanzi R, Sjostrom K, Bjornbom E. Rapid pyrolysis of agricultural residues at high temperature, Biomass and Bioenergy. 2002; (23)357-366.
- WHO. World Health Organization. Report on the Global Tobacco Epidemic. Raising taxes on tobacco. 2015.
- Wong J, Magun BE, Wood LJ. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;23;11:1391-401.
- Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol*. 2014;542:243-62.
- Yamashita CM, Radisky DC, Aschner Y, Downey GP. The importance of matrix metalloproteinase-3 in respiratory disorders. *Expert Rev Respir Med*. 2014;8(4):411-21.
- Yao H, Edirisinghe I, Yang SR, Rajendrasozhan S, Kode A, Caito S, Adenuga D, Rahman I. Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *Am J Pathol*. 2008;172(5):1222-37.
- Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 254: 72–85.
- Yao H, Chung S, Hwang JW, Rajendrasozhan S, Sundar IK, Dean DA, McBurney MW, Guarente L, Gu W, Rönty M, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *J Clin Invest*. 2012 Jun;122(6):2032-45.
- Yeager RP, Kushman M, Chemerynski S, Weil R, Fu X, White M, Callahan-Lyon P, Rosenfeldt H. Proposed Mode of Action for Acrolein Respiratory Toxicity Associated with Inhaled Tobacco Smoke. *Toxicol Sci*. 2016;Jun;151(2):347-64.
- Young B, Heath JW. Wheater histologia funcional: texto e atlas em cores. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Zheng H, Liu Y, Huang T, Fang Z, Li G, He S. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. *Toxicol Lett*. 2009; Sep 28;189(3):225-34.

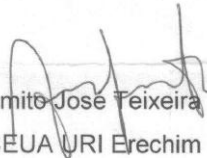
ANEXOS

Erechim, 20 de novembro de 2014.

Carta de Aprovação

O projeto intitulado “**Análise histológica, hematológica e bioquímica de camundongos Swiss expostos a fumaça de cigarro de palha e cigarro industrial associado ao extrato de erva-mate (ILEX Paraguariensis) ST. Hil**”, de responsabilidade da professora Fernanda Dal'Maso Câmara, foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA URI Erechim) e está adequado a LEI 11.794 DE 08 DE OUTUBRO DE 2008 que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. O projeto foi considerado aprovado sem nenhuma restrição.

Atenciosamente,


Amilton José Teixeira
Coordenador da CEUA URI Erechim
amito@uricer.edu.br
54 3520 9000



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 037-2014-02

Professor responsável: Paulo Cesar Lock Silveira

Equipe: Ricardo Aurino de Pinho, Fernanda DalMaso, Silvane Souza Roman, Alice Terezinha Valduga.

Título: "Efeitos antioxidantes do extrato de erva-mate (*IlexParaguariensis*) ST. Hil sobre as alterações histopatológicas e bioquímicas pulmonares induzidas pela exposição crônica ao cigarro de palha e cigarro industrial".

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 63 Camundongos C57Bl/6, com 60 dias, pesando aproximadamente 50 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 037-2014-02

Principal Investigator: Paulo Cesar Lock Silveira

Researchers: Ricardo Aurino de Pinho, Fernanda DalMaso, Silvane Souza Roman, Alice Terezinha Valduga.

Project title: "Antioxidant effects of the extract of yerba mate (*IlexParaguariensis*) ST. Hil on pulmonary histopathological and biochemical alterations induced by chronic exposure to hand-rolled cigarettes and cigarette industry.."

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 10 de setembro de 2014.

VILSON HEINZEN CARDOSO
 Coordenador Adjunto da CEUA